

**DIE OXYDATION DES LACTUCOPIKRINS UND
DER 4-HYDROXYPHENYLESSIGSÄURE
DURCH PEROXYDASE**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

1964

vorgelegt von

Fritz Walter

aus Hamburg

DIE OXYDATION DES LACTUCOPIKRINS UND DER 4-HYDROXYPHENYLESSIGSÄURE DURCH PEROXYDASE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Fritz Walter

aus Hamburg

1. Referent: Prof. Dr. G. Schenck

2. Referent: Priv.-Doz. Dr. H. Loth

Tag der mündlichen Prüfung 9. 6. 64

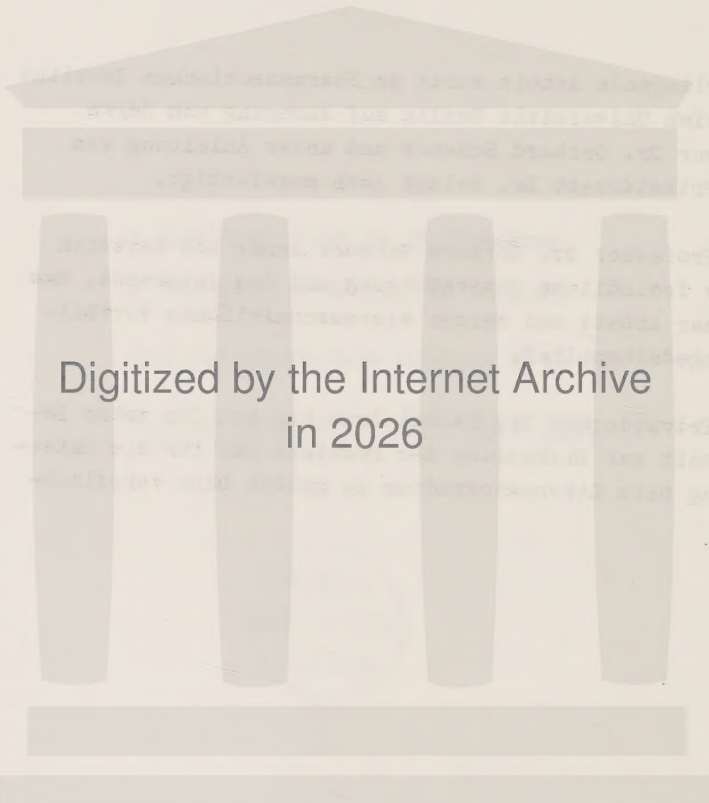
Tag der Promotion: 29. JULI 1964



Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin auf Anregung von Herrn Professor Dr. Gerhard Schenck und unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. Helmut Loth angefertigt.

Herrn Professor Dr. Gerhard Schenck danke ich herzlich für die freundliche Unterstützung und das Interesse, das er meiner Arbeit und meiner wissenschaftlichen Fortbildung angedeihen ließ.

Herrn Privatdozent Dr. Helmut Loth bin ich für seine Bereitschaft zur Diskussion der Probleme und für die Unterstützung beim Literaturstudium zu großem Dank verpflichtet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	4
II. ALLGEMEINER TEIL	7
A. Die Oxydation der 4-Hydroxyphenylessig- säure durch Wasserstoffperoxyd bei An- wesenheit von Peroxydase	7
1. Das Spektrum der 4-Hydroxyphenyles- sigsäure	7
2. Veränderungen des Spektrums nach der Oxydation	8
3. Verfolgung des zeitlichen Ablaufes der Oxydation	11
4. Chromatographie der Oxydationsprodukte	13
5. Isolierung eines Oxydationsproduktes	15
6. Versuche zur Identifizierung dieses Produktes	16
B. Versuche zur Oxydation des Lactucins mit Wasserstoffperoxyd in Gegenwart von Peroxidase	22
C. Untersuchungen über die enzymatische Oxy- dation des Lactucopikrins durch Peroxydase	26
1. Das Spektrum des Lactucopikrins	26
2. Versuche zur Oxydation des Lactucopikrins	27
3. Gewinnung eines Gemisches der Oxydations- produkte von Lactucopikrin und seine Un- tersuchung	28
4. Hydrierung und Hydrolyse der Oxydations- produkte und ihre Charakterisierung	32
5. Isolierung von Hexahydrolactucin aus dem Gemisch der hydrierten Oxydationsprodukte	35
6. Isolierung einer Fraktion aus dem Gemisch der Oxydationsprodukte	36
7. Untersuchung des Oxydationsproduktes B aus dem Gemisch der Oxydationsprodukte und seine Charakterisierung	37

	Seite
III. DISKUSSION	41
IV. EXPERIMENTELLER TEIL	45
A. Darstellung der Substanzen	45
1. Darstellung der 4-Hydroxyphenylelessigsäure	45
2. Darstellung des Lactucopikrins	46
3. Darstellung des Lactucins	46
B. Beschreibung der Versuchsanordnung	49
1. Allgemeines	49
a. Peroxydase	49
b. Wasserstoffperoxyd	50
c. Pufferlösungen	50
d. Spektralphotometer	50
e. Schmelzpunktapparat	51
2. Die Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessig- säure	51
a. Spektrum der 4-Hydroxyphenylelessigsäure	51
b. Stammlösung der 4-Hydroxyphenylelessig- säure	51
c. Reaktionslösung für die Spektralpho- tometrie	51
d. Verfolgung des zeitlichen Ablaufes der Oxydation	52
e. Chromatographie der Oxydationsprodukte	52
f. Darstellung eines Oxydationsproduktes	53
g. Versuche zur Identifizierung des Oxyda- tionsproduktes B'	54
3. Versuche zur Oxydation des Lactucins durch Wasserstoffperoxyd und Peroxydase	57
a. Spektrum des Lactucins	57
b. Reaktionslösung für spektrophotome- trische Messungen	57
c. Papierchromatographie der Reaktions- lösung	57
d. Reaktionslösung mit Lactucin und 4-Hydroxyphenylelessigsäure und ihre Papierchromatographie	58

4. Untersuchungen über die Oxydation des Lactucopikrins	59
a. Spektrum des Lactucopikrins	59
b. Reaktionslösung für die spektralphotometrische Untersuchung	59
c. Reaktionsansatz zur Gewinnung der Oxydationsprodukte	59
d. Hydroxamsäureprobe	60
e. Reaktion von Lactucin, Lactucopikrin und dem Gemisch der Oxydationsprodukte des Lactucopikrins mit einer methanolischen Kalilauge	60
f. Hydrierung der Oxydationsprodukte	61
g. Hydrolyse des hydrierten Gemisches der Oxydationsprodukte und seine Chromatographie	63
h. Isolierung des Hexahydrolactucins	64
i. Isolierung einer Fraktion aus dem Gemisch der Oxydationsprodukte	65
j. Untersuchung des Oxydationsproduktes B aus dem Gemisch der Oxydationsprodukte und seine Charakterisierung	66
V. ZUSAMMENFASSUNG	68
VI. LITERATURVERZEICHNIS	70

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Der getrocknete Milchsaft des Giftlattichs, *Lactuca virosa*, wurde schon im Altertum als Schlafmittel benutzt. Als Lactucarium wurde er im 19. Jahrhundert in mehreren Pharmacopoeen angeführt. In Deutschland war er zuletzt in der 2. Ausgabe des Deutschen Arzneibuches und der 5. Ausgabe des Ergänzungsbuches von 1930 officinell und wurde als Sedativum bei Reizhusten verwendet (16). B.F.WALZ (49) isolierte 1839 das Lactucin aus dem Milchsaft. Als zweiten Inhaltsstoff erhielten H.LUDWIG und A.KROMAYER (25) 1862 das noch unreine Lactucopikrin, das von G.SCHENCK und H.GRAF (33) 1937 rein dargestellt wurde. Später wurde von A.SCHMITT (37) auch aus anderen *Lactuca*-arten und aus *Cichorium intybus* und *C. endivia* Lactucopikrin isoliert.

Die Dosierung und Wirkung des Lactucariums wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben, da der Gehalt beider Substanzen in den einzelnen Drogen sehr variiert. G.SCHENCK und H.GRAF (32) führten dieses auf eine Zerstörung beider Substanzen im feuchten Milchsaft zurück. Um ein haltbares und deswegen auch besser dosierbares Präparat zu bekommen, arbeiteten letztere Autoren ein neues Verfahren aus, das zur Herstellung der Latucylpräparate führte.

Über die Konstitution des Lactucins war bis 1958 nur wenig bekannt. In den unabhängigen Arbeiten von D.H.R.BARTON und C.R.NARAYANAN (3) und L.DOLEJS, V.HEROUT und F.SORM (14) konnte die Konfiguration geklärt werden. Danach ist Lactucin $C_{15}H_{16}O_5$ ein Sesquiterpen der Guaianolidreihe.

Das Lactucopikrin $C_{23}H_{22}O_7$ wurde von A.ZINKE und K.HOLZER (23) und H.MICHL und G.HÖGENAUER (27) als Monoester des Lactucins mit 4-Hydroxyphenylessigsäure erkannt. (Abb. 1)

Schon G.SCHENCK und H.GRAF (32) und K.H.BAUER und K.BRUNNER (4) hatten im frischen Milchsaft der Pflanze oxydierende Fermente festgestellt.

In seiner ausführlichen Arbeit über Lactucin und Lactucopikrin stellte A.SCHMITT (37) fest, daß der Lactucopikringle-

halt eines frisch gewonnenen Milchsafte in einer halben Stunde um 50% vermindert wird. Diese Zerstörung kann durch Vermischen des Milchsafte mit Äthanol oder Salzsäure verhindert werden.

Bei einer Einwirkung von frischem Milchsaft auf Pyrogallol bildete sich Purpurogallin. Die Aktivität der Peroxydase und Oxydase wurde durch die Purpurogallinmethode bestimmt.

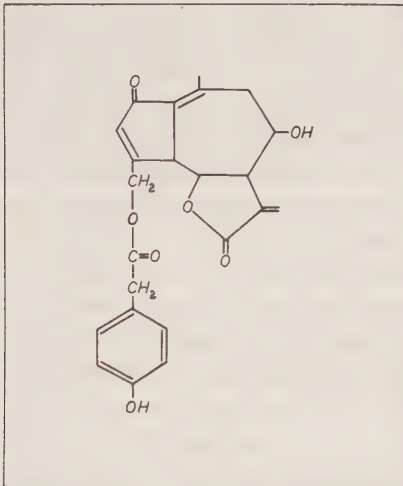


Abb. 1
Lactucopikrin

Dabei stellte A.SCHMITT eine Peroxydaseaktivität fest, die weitaus höher liegt als beim Meerrettich. Bei Versuchen ohne Wasserstoffperoxyd bildeten sich durch die Einwirkung der Oxydasen nur 4% der von beiden Fermentsystemen erhaltenen Purpurogallinmenge.

F.WENDT (50) prüfte die Beständigkeit des Lactucopikrins im Milchsaft im pH-Bereich 2-7. Unterhalb und oberhalb dieser Grenzen wird die Substanz auch in wässrigen Lösungen zerstört. Er stellte dabei fest, daß das zerstörende Ferment-system die größte Wirkung bei pH 5 erreicht, dem pH-Wert, der der Acidität des Milchsafte entspricht. Bei einer Erhitzung des Milchsafte auf 80°C war nach F.WENDT mit Guajakharztinktur und H₂O₂ keine Aktivität der Peroxydase mehr zu erkennen; trotzdem war noch eine steile Abnahme

des Lactucopikrins im Milchsaft zwischen 80-90°C festzustellen. Nach Erhitzen auf 100°C war der Lactucopikringehalt über eine Woche konstant. Ein auf 80°C erhitzter Milchsaft reagierte aber noch mit p-Kresol und p-Aminophenol. Der Autor führte dieses auf eine nachgewiesene Phenoloxydase zurück. F.WENDT kommt am Schluß der Arbeit zu der Feststellung, daß die Peroxydase das Lactucopikrin nicht wesentlich angreift.

F.WENDT (50) untersuchte die Stabilität des Lactucopikrins im Milchsaft, unternahm jedoch keinen Versuch mit reinem Lactucopikrin, bei dem die Oxydation mit gereinigter Peroxydase anstelle des Milchsaftes ausgeführt wurde. Zur Kontrolle, ob überhaupt eine Reaktion zwischen Lactucopikrin und dem Peroxydase-Wasserstoffperoxydkomplex eintritt, wurde die Substanz nunmehr in wässrigen, gepufferten Lösungen daraufhin untersucht.

Inzwischen war die Konstitution geklärt worden. Danach war zu erwarten, daß eine Reaktion mit Wasserstoffperoxyd in Gegenwart von Peroxydase mit der Hydroxylgruppe der 4-Hydroxyphenylelessigsäure stattfindet. Außerdem war durch M.SUCHY, V.HEROUT und F.SORM (44) bekannt, daß die Guaianolide Cynaropicrin, Xanthinin und Ambrosin, die ebenso wie das Lactucin bzw. Lactucopikrin eine Vinylgruppe im γ -Lactonring besitzen, besonders leicht polymerisieren.

Für die Untersuchung des Reaktionsvermögens von Lactucopikrin mit Wasserstoffperoxyd und Peroxydase wurden zuerst die 4-Hydroxyphenylelessigsäure, dann der Alkohol Lactucin und schließlich deren Ester Lactucopikrin herangezogen.

Als erstes wurden die Spektren dieser Substanzen vor und nach der Zugabe von Wasserstoffperoxyd und Peroxydase verglichen.

II. ALLGEMEINER TEIL

A. Die Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure durch Wasserstoffperoxyd bei Anwesenheit von Peroxydase

1. Das Spektrum der 4-Hydroxyphenylelessigsäure

4-Hydroxyphenylelessigsäure absorbiert UV-Strahlen im ultravioletten Bereich bis 300 nm. Das Spektrum (Abb. 2) zeigt zwei charakteristische Banden, die in ähnlicher Lage auch bei Phenol und p-Kresol gefunden werden. (10,15)

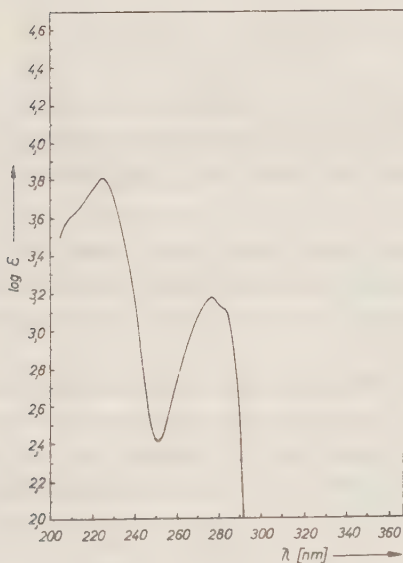


Abb. 2
4-Hydroxyphenylelessigsäure in 70%igem Methanol (v/v).

Die Spektren der beiden angeführten Substanzen stimmen auch in der Form des zweiten Maximums mit der der 4-Hydroxyphenylelessigsäure überein. Bei allen drei Spektren tritt nach dem langwelligen Maximum der Absorptionskurve eine kurze Schulter auf.

Eine Übersicht über die Maxima der Absorptionskurve der Säure in 70%igem Methanol (v/v) zeigt Tabelle 1.

	1. Maximum 225 nm	2. Maximum 277 nm
E 1% 1 cm	425	100
ϵ (Liter/mol·cm)	6460	1520

Tab. 1. Maxima, molare Extinktionskoeffizienten und spez. Extinktionen der 4-Hydroxyphenylelessigsäure in 70%igem Methanol (v/v).

2. Veränderungen des Spektrums nach der Oxydation

Bei den Oxydationsversuchen mit Peroxydase und Wasserstoffperoxyd wurde die Veränderung der 4-Hydroxyphenylelessigsäure zunächst spektrophotometrisch untersucht.

Bei einer Konzentration von 20 μ mol 4-Hydroxyphenylelessigsäure in 100 ml Reaktionslösung lagen sowohl das kurzwellige als auch das langwellige Maximum der Absorptionskurve in einem günstigen Meßbereich für das Spektralphotometer.

Da im stärker sauren Bereich eine Inaktivierung des Fermentes und im alkalischen eine Autoxydation des Substrates eintritt, wurde die Oxydation in Lösungen bei pH 3, 5 und 7 beobachtet. Dazu wurden die Absorptionen der Säure in diesen drei pH-Bereichen mit dem Spektralphotometer gemessen. (Abb.3)

Gegenüber der methanolischen Lösung war in den gepufferten Lösungen die Lage der Maxima und des Minimums kaum verändert. Während sich die Extinktion im zweiten Maximum bei pH 3, 5 und 7 nicht veränderte, nahm sie mit fallender Wasserstoffionenkonzentration in der ersten Bande zu.

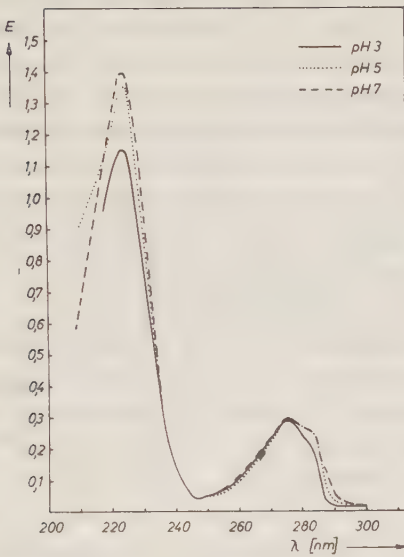


Abb. 3
4-Hydroxyphenylacetic-
säure 20 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$
Pufferlösung.

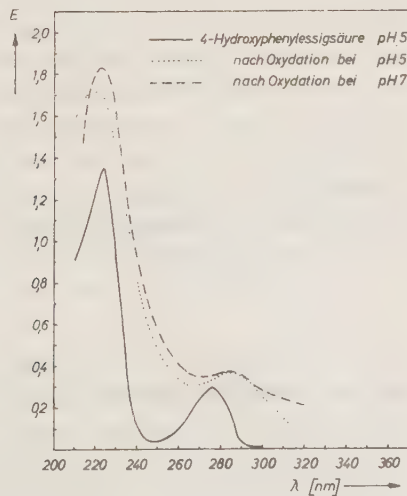


Abb. 4
4-Hydroxyphenylacetic-
säure bei pH 5 und
nach der Oxydation
mit 5 Ox-val. H_2O_2
bei pH 5 und 7.

Zu Beginn der Oxydationsversuche mußte geklärt werden, ob sich das Spektrum der 4-Hydroxyphenylelessigsäure mit Wasserstoffperoxyd einerseits oder mit Peroxydase andererseits verändert. Nach 6 Stunden wurde in beiden Fällen festgestellt, daß dies nicht der Fall war.

Dagegen ließ sich bei Zugabe beider Partner eine Veränderung des Spektrums nach 30 Minuten beobachten. Auch eine Gelbfärbung der Meßlösung war deutlich zu erkennen.

Um einen Überblick zu bekommen, in welchem Maß bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure Wasserstoffperoxyd verbraucht wird, wurde den Reaktionslösungen mit $20\mu\text{mol}$ 4-Hydroxyphenylelessigsäure 1, 2, 3, 4 oder 5 Oxydationsäquivalente Wasserstoffperoxyd hinzugesetzt. Dagegen war die Zugabe von Peroxydase bei allen im Spektralphotometer gemessenen Lösungen gleich. Sie betrug $6,8 \cdot 10^{-10}$ mol Peroxydase pro 100 ml Reaktionslösung.

Nach einer Reaktionszeit von drei Stunden veränderten sich die Spektren der Lösungen im pH-Bereich 3-7 nicht mehr. Die Absorptionen waren in allen diesen Lösungen gegenüber denen ohne Zusatz von Peroxydase stark verschieden. So wurde bei den Messungen nach der Oxydation eine Erhöhung der Absorption im Bereich 205-300 nm festgestellt. Die Lage des kurzwelligen Maximums war kaum verändert aber verbreitert. Das zweite Maximum war bathochrom verschoben, wie es bei einer Oxydation von Phenolen zu erwarten war. So tritt dieselbe Erscheinung bei einer Oxydation von p-Kresol auf (52). Im zweiten Maximum trat nur eine geringe Extinktionszunahme ein. Die größte Absorptionsänderung zeigte sich im Minimum. (Abb. 4)

Bei einer Oxydation mit 5 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 waren die Extinktionszunahmen bei den einzelnen Wasserstoffionenkonzentrationen sehr verschieden. Während bei pH 3 ein verhältnismäßig sehr schwacher Anstieg zu beobachten war, trat eine erhebliche Zunahme bei Erhöhung des pH-Wertes auf. So konnte nach dem Ende der Reaktion bei pH 7

im Minimum der Absorptionskurve eine 13fache Extinktions-
erhöhung gegenüber der nicht oxydierten Lösung beobachtet
werden.

Bei Oxydationen mit kleineren Wasserstoffperoxydmengen
konnte festgestellt werden, daß die größte Veränderung
bei pH 5 und 7 schon mit 2 Äquivalenten Wasserstoffperoxyd
erreicht werden konnte, bei pH 3 sogar mit nur 1 Äqui-
valent. Nach Zusatz von weiterem Wasserstoffperoxyd blie-
ben die Absorptionen zwischen pH 3 und 7 unverändert.
Dabei war der Extinktionsanstieg den zugegebenen Mengen
an Oxydationsmittel nicht proportional. (Abb. 5)

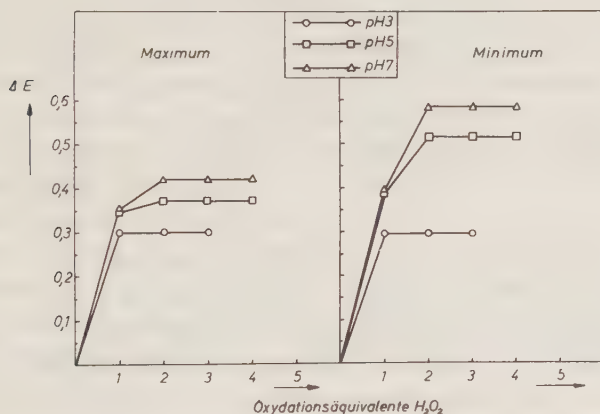


Abb. 5

Extinktionsdifferenzen im kurzwelligen Maximum und im
Minimum nach der Oxydation der 4-Hydroxyphenylessig-
säure in Abhängigkeit von den zugesetzten Mengen an
 H_2O_2 .

3. Verfolgung des zeitlichen Ablaufes der Oxydation

Zur Beobachtung des zeitlichen Ablaufes der Oxydation bot
sich die erhebliche Extinktionszunahme im Minimum der
Absorptionskurve während der Reaktion an.

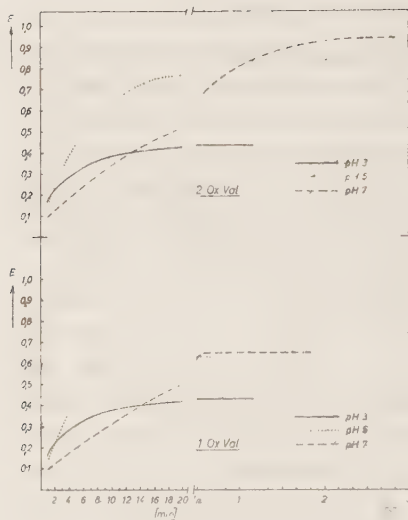


Abb. 6
Oxydation der
4-Hydroxyphenyl-
essigsäure
(30 μ mol/100 ml).
Extinktionszunahme
im Minimum bei
1 und 2 Ox-val. H_2O_2
und
 $10,2 \cdot 10^{-10}$ mol
Peroxydase.

Da aber bei einer Konzentration von 20 μ mol 4-Hydroxyphenylessigsäure in 100 ml Reaktionslösung die Extinktion im Minimum sehr klein ist und für Absorptionsbestimmungen im Spektralphotometer ungünstig liegt, wurde bei diesen Versuchen eine Konzentration von 30 μ mol je 100 ml Reaktionslösung verwendet.

Den Lösungen wurden bei pH 3, 5 und 7 nun $1,5$ und $3 \cdot 10^{-5}$ mol H_2O_2 = 1 und 2 Oxydationsäquivalente und $10,2 \cdot 10^{-10}$ mol Peroxydase zugesetzt. Es trat nach der Zugabe des Fermentes sofort ein starker Extinktionsanstieg ein. (Abb.6)

Der steilste Absorptionsanstieg war bei pH 5 festzustellen, wie auf der Abbildung zu erkennen ist. Die Reaktionszeit hängt von der Wasserstoffionenkonzentration und der Menge des Oxydationsmittels ab und reicht von 11 - 140 Minuten.

4. Chromatographie der Oxydationsprodukte

Um einen Überblick über die Menge und die Anzahl der bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure mit Peroxydase - H_2O_2 entstehenden Produkte zu bekommen, wurden die Reaktionslösungen sowohl dünn-schicht- als auch papier-chromatographisch untersucht. Es wurde hierzu bei pH 5 gearbeitet, da F.WENDT (50) im Milchsafte der *Lactuca virosa* dieses pH-Milieu gefunden hatte. Da wässrige Reaktionsansätze verglichen wurden, wurde, um ein schnelles Auftragen zu ermöglichen, mit wesentlich konzentrierteren Lösungen gearbeitet. Das Verhältnis der Reaktionspartner untereinander blieb aber dabei gleich.

Als Laufmittel für 4-Hydroxyphenylelessigsäure schlägt E.STAHL (42) ein Gemisch von Essigester-Hexan 75:25 auf Kieselgelplatten vor. Bei einer Entwicklung eines Chromatogrammes der Reaktionslösungen mit diesem System blieben alle Oxydationsprodukte am Start liegen. Bei Zusatz von kleinen Mengen Eisessig und unter Verwendung besonders gereinigter Lösungsmittel war mit dem Gemisch Essigester-Hexan-Eisessig 75:24:1 (v/v/v) eine gute Auftrennung zu erzielen. Bei den Untersuchungen wurde den Reaktionslösungen 0,5, 1, 2, 3, 4 und 5 Oxydationsäquivalente Wasserstoffperoxyd zugesetzt. In den Ansätzen mit 2, 3, 4 und 5 Äquivalenten wurden die Lösungen schnell trübe und färbten sich gelb.

Bei der Papierchromatographie mit Isopropanol-Ammonium-Wasser 7:1:3 (v/v/v) wurde eine noch deutlichere Trennung erzielt. Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden waren auf dem Papierchromatogramm bis zu 6 Oxydationsprodukte zu unterscheiden, die alle einen kleineren Rf-Wert besaßen als die 4-Hydroxyphenylelessigsäure. Die drei in größeren Mengen auftretenden Produkte wurden mit A', B', C' bezeichnet. (Abb. 7)

Mit ansteigenden Wasserstoffperoxydmengen nahm das Substrat ab. Nach dem Chromatogramm ist die Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure mit zwei Äquivalenten H_2O_2 bei

pH 5 abgeschlossen.

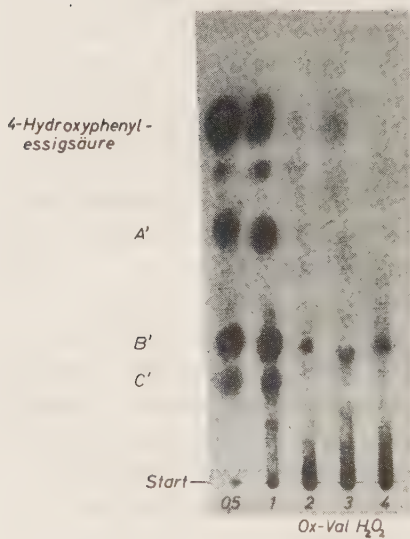


Abb. 7

Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure mit verschiedenen H_2O_2 -Mengen. Die Oxydationsprodukte wurden auf Durchlaufchromatogrammen entwickelt.

Der Vorteil der Papierchromatographie und der Dünnschichtchromatographie war es, daß die Zahl der Folgeprodukte und auch ihre ungefähre Menge erkannt werden konnten.

Die Rf-Werte für A', B' und C' wurden aus mehreren Papierchromatogrammen gemittelt und betragen für A' $R_f=0,45$; B' $R_f=0,30$; C' $R_f=0,23$. 4-Hydroxyphenylelessigsäure besitzt in diesem Laufmittel den Rf-Wert 0,6.

Die drei Substanzen sind mengenmäßig bei der Oxydation mit 1 Oxydationsäquivalent H_2O_2 am stärksten vertreten. Schon bei Verdoppelung dieser Menge sind die Produkte A' und C' nicht mehr nachzuweisen. Nach dem Chromatogramm ist die Bildung der Substanz B' ($R_f\text{-Wert}=0,3$) bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure mit 0,5 und 1 Ox-val. H_2O_2 und Peroxydase mengenmäßig begünstigt. Ihre Anwesenheit konnte noch in Ansätzen mit 5 Äquivalenten Wasserstoffperoxyd nachgewiesen werden.

5. Isolierung eines Oxydationsproduktes

Da bei der Oxydation von 4-Hydroxyphenylelessigsäure mit Peroxydase und kleinen Mengen Wasserstoffperoxyd bei pH 5 nicht nur hochpolymere Produkte entstehen, war es interessant, die in den Reaktionsansätzen nachgewiesenen Zwischenprodukte zu untersuchen.

Da die Substanz B' mit dem Rf-Wert 0,3 der Menge nach hervortrat, wurde versucht, diese zu isolieren.

Die chromatographischen Versuche hatten veranschaulicht, daß sich bei keiner bestimmten Oxydationsmittelmenge nur diese Substanz allein gebildet hatte. Auch in Reaktionslösungen mit 2 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 , aus denen Proben in kurzen, bestimmten Zeitintervallen entnommen wurden und in denen die Peroxydase mit Kaliumcyanid inhibiert wurde, war zu keiner Zeit das Produkt B' allein zu erkennen. Zur Isolierung mußte deswegen nicht nur das günstigste Oxydationsverhältnis, bei dem die Substanz B' am meisten hervortrat, sondern auch ein Verfahren gefunden werden, das zur Abtrennung der nicht erwünschten Produkte geeignet war.

Beim Vergleich der einzelnen Oxydationsansätze mit verschiedenen Wasserstoffperoxydmengen an Hand der Dünnschicht- und Papierchromatographie bot sich die Oxydation mit nur 1 Oxydationsäquivalent Wasserstoffperoxyd an, da hier die optimale Menge an Substanz B' gebildet wurde.

Zu ihrer Gewinnung wurde in den Reaktionsansätzen die gleiche Konzentration eingehalten, wie sie bei den einzelnen Lösungen mit verschiedenen H_2O_2 -Mengen zur Chromatographie verwendet wurden. Die einzelnen größeren Reaktionsansätze wurden nach zwei Stunden mit Essigester ausgeschüttelt. Hierbei blieben die höherpolymeren Substanzen, die bei der Chromatographie am Start liegengeblieben waren, in der wässrigen Phase zurück. Die Essigesterlösungen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und in schonender Weise konzentriert.

In ähnlicher Art wie bei der Dünnschichtchromatographie konnte mit dem gleichen Entwicklungsgemisch Essigester-Hexan-Eisessig 75:24:1 (v/v/v) an Kieselgelsäulen eine

Trennung der Zwischenprodukte erreicht werden. Nach einem größeren Vorlauf trat die nicht oxydierte 4-Hydroxyphenyl-essigsäure zuerst aus der Säule. Darauf wurden die einzelnen Zonen in einem Fraktionssammler aufgefangen.

Die Rohausbeute der Fraktionen A' und C' war so gering und noch verunreinigt, daß auf eine Aufarbeitung trotz mehrerer Oxydationsansätze verzichtet wurde. Bei den Produkten handelte es sich um die Substanzen mit den Rf-Werten 0,45 und 0,23. Die Fraktion B' wurde in Mengen erhalten, die für eine weitere Untersuchung verwendet werden konnten.

6. Versuche zur Identifizierung dieses Produktes

Nach Entfernung des Lösungsmittelgemisches Essigester-Hexan-Eisessig 75:24:1 (v/v/v) fiel das Rohprodukt der Substanz B' in sirupähnlicher Konsistenz an.

Im Gegensatz zur 4-Hydroxyphenylessigsäure war der Sirup nicht in Äther löslich. Nur durch stärker polare Lösungsmittel wie Methyläthylketon, Aceton, Dioxan, Eisessig, Äthanol und Methanol wurde er mehr oder weniger gelöst.

Aus diesen Solventien ließ sich das Rohprodukt aber nicht umkristallisieren. Auffällig leicht war es - wie die 4-Hydroxyphenylessigsäure - in kaltem Wasser zu lösen.

So wurde das Produkt in sehr wenig Wasser bei 70°C gelöst.

Nach dem Erkalten schied sich ein braungelbes Öl in größerer Menge ab, das sich von der wässrigen Lösung abtrennen ließ. Die Lösung wurde schonend konzentriert bis sich weiße Kristalle abschieden, die sich noch zweimal aus heißem Wasser umkristallisieren ließen. Nach der Entwicklung eines Chromatogrammes von 300γ dieses Produktes auf Schleicher und Schüll-Papier 2043 b mit Isopropanol-Ammoniak-Wasser 7:1:3 (v/v/v) zeigte sich ein Fleck mit dem Rf-Wert 0,3. Dieser fluoreszierte unter einer UV-Lampe (Strahlungsmaximum 254 nm) stark, während der Fleck der 4-Hydroxyphenylessigsäure dunkel erschien.

Der Schmelzpunkt des Oxydationsproduktes lag bei 190-191°C.

Die Substanz bestand aus feinen Nadeln, die miteinander verfilzt waren.

Die Kristalle schmeckten sauer. Eine gesättigte Natriumkarbonatlösung entwickelte Kohlendioxyd, nachdem einige Kristalle eingeworfen wurden.

Das Spektrum des Oxydationsproduktes wurde in 70%igem Methanol (v/v) aufgenommen. Die Absorptionskurve zeigt eine stärkere Betonung des Maximums (215 nm), das hypsochrom verlagert ist. Das zweite Maximum (288 nm) ist gegenüber dem im 4-Hydroxyphenylelessigsäurespektrum bathochrom verschoben und ebenfalls stärker. (Abb. 8, Tab. 2) Die verstärkte Absorption dieser Substanz gegenüber 4-Hydroxyphenylelessigsäure im UV-Bereich läßt sich mit den Polymeren des p-Kresols vergleichen (52).

Ein Beweis für phenolische Gruppen in dem Oxydationsprodukt B' wurde durch folgende Reaktion erbracht. Nach Zusatz von 2,5% Kaliumhydroxyd in Substanz zu der im Spektralphotometer gemessenen Lösung wurde das zweite Minimum (288 nm) weiter zum sichtbaren Licht verschoben. Es bildete sich ein neues Maximum bei 318 nm.

Bei einem Vergleich der IR-Spektren der 4-Hydroxyphenylelessigsäure und ihres Oxydationsproduktes wich das Spektrum der Substanz B' kaum von dem der 4-Hydroxyphenylelessigsäure ab. In beiden Spektren waren eine starke und breite Bande bei 3200 cm^{-1} , die der phenolischen Hydroxylgruppe zuzuordnen ist und wiederum eine starke Bande bei 1720 cm^{-1} , die der Carboxylgruppe angehört, zu erkennen.

Nach einer Verbrennung der Substanz B' wurden folgende gemittelte Werte gefunden und den berechneten der 4-Hydroxyphenylelessigsäure und ihrer trimeren Substanz gegenübergestellt. Zur Errechnung der Werte der letzten Substanz wurde bei der Polymerisation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure eine Dehydrierung in ortho-Stellung zur Hydroxylgruppe angenommen.

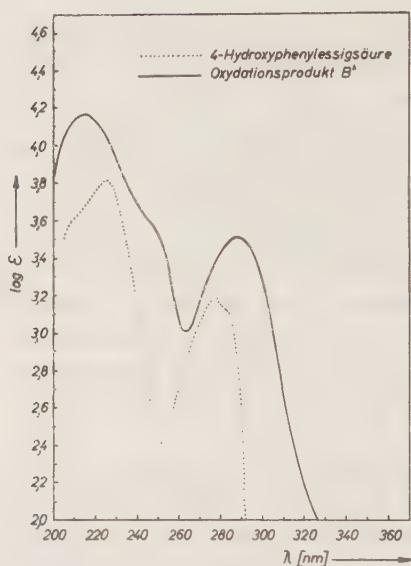


Abb. 8

Spektren der 4-Hydroxyphenylacetic acid und ihres Oxydationsproduktes B' in 70%igem Methanol (v/v). Bei der Berechnung von ϵ wurde beim Oxydationsprodukt B' das Molekulargewicht der monomeren Ausgangssubstanz zugrundegelegt.

	1. Maximum		2. Maximum	
	nm	E 1% 1 cm	nm	E 1% 1 cm
4-Hydroxyphenylacetic acid	225	425	277	100
Oxydationsprodukt B'	215	967	288	213

Tab. 2 Die Lage der Maxima und die spezifischen Extinktionen in 70%igem Methanol (v/v).

Oxydationsprodukt B' gef.: C: 62,03 % H: 4,73 %

Trim.Oxydationsprdk.ber.: C: 63,71 % H: 4,45 %

4-Hydroxyphenylessig-

säure ber.: C: 63,1 % H: 5,3 %

Zur Bestimmung des Hydroxylgruppengehaltes wurden Versuche zur Acetylierung unternommen. Es gelang jedoch nicht, ein acetyliertes Produkt zu gewinnen. Bei Durchsicht der Literatur wurde auch keine Darstellung der 4-Acetoxyphenylessigsäure gefunden.

Da letztere Versuche mißlingen, wurde die restliche Substanz B' in absolutem Methanol gelöst und mit einer ätherischen Diazomethanolösung versetzt. Es trat eine heftige Reaktion ein. Nach dem Verdampfen der Lösungsmittel blieb eine fast farblose Flüssigkeit zurück, die einen eigenartigen Geruch besaß.

Diese Substanz reagierte nicht mehr mit einer Natriumkarbonatlösung. Phenolische Funktionen ließen sich aber durch Tüpfeln mit Folin-Ciocalteu-Reagenz (20) nachweisen.

Demnach war anzunehmen, daß es sich bei der Flüssigkeit um den Methylester des Oxydationsproduktes B' handelt. Bei einer Methoxylgruppenbestimmung wurde ein Gehalt von 19,94% Methoxylgruppen für die Flüssigkeit bestimmt. Der berechnete Wert für drei veresterte Carboxylgruppen beträgt 17,21%, zusammen mit einer verätherten, phenolischen Gruppe 22,95%. Demnach war bei der Methylierung mit Diazomethan nur ein sehr kleiner Teil der phenolischen Hydroxylgruppen veräthert worden.

Bei einer Verbrennung wurden folgende Werte gefunden:

Methyliertes Oxydationsprodukt B' gef.: C: 64,51 % H: 5,88 %

"

"

berechnet: C: 65,2 % H: 5,30 %

Bei der Berechnung der Werte für das methylierte Oxydationsprodukt B' wurde von der gleichen Voraussetzung ausgegangen wie auf Seite 17. Bei der Flüssigkeit handelte es sich nun aber um den Ester.

Da es weder gelungen war, die phenolischen Hydroxylgruppen

zu acetylieren noch zu methylieren, wurde das methylierte Oxydationsprodukt B' einer aktiven Wasserstoffbestimmung in Anethol nach Zerewitinoff unterworfen. Aus der entwickelten Methanmenge ließen sich 3,5 Atome Wasserstoff für einen trimeren 4-Hydroxyphenylessigsäuremethylester berechnen.

Sowohl nach den UV - und IR- Spektren der Substanz B', den CH-Werten und der Methoxylgruppenbestimmung in Verbindung mit der aktiven Wasserstoffbestimmung als auch nach den Ergebnissen, die W.W.WESTERFELD und Ch.LOWE (52) bei der Oxydation des p-Kresols mit Wasserstoffperoxyd und Peroxydase fanden - es trat eine Polymerisation des p-Kresols ein - konnte eine polymere Struktur des Oxydationsproduktes B' angenommen werden.

Zum Beweis führten wir Molgewichtsbestimmungen mit dem methylierten Oxydationsprodukt B' in einem Dampfdruckosmometer durch. Hierbei wurden 552 als gemittelter Wert gefunden. Für den trimeren Hydroxyphenylessigsäuremethylester errechnet sich nach Berücksichtigung einer Polymerisation in ortho-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe ein Molekulargewicht von 494,5.

Auf Grund der Molgewichtsbestimmungen konnte eine trimere Struktur für das isolierte Oxydationsprodukt der 4-Hydroxyphenylessigsäure angenommen werden.

Da nach der Bestimmung des aktiven Wasserstoffes keine Hydroxylgruppe bei der Polymerisation veräthert worden war und die Carboxylgruppen noch vorhanden sind, kann die Polymerisation nur in ortho- oder meta-Stellung zur Hydroxylgruppe erfolgt sein.

Da die Oxydation des p-Kresols mit Peroxydase-H₂O₂ einerseits und mit Eisen(III)-chlorid andererseits zu den gleichen Oxydationsprodukten führte (7), war es interessant, diese Reaktion mit Eisen(III)-chlorid bei der 4-Hydroxyphenylessigsäure zu versuchen.

Nach der Oxydation in wässrigen Lösungen unter verschiedenen Bedingungen (verschiedener pH, Temperaturveränderung, wechselnde Mengen Eisen(III)-chlorid) wurde die Lösung mit Reaktionsansätzen der fermentativen Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure auf einem Papierchromatogramm (Laufmittel: Isopropanol-Ammoniak-Wasser 7:1:3 (v/v/v)) verglichen. Bei der Oxydation mit Eisen(III)-chlorid waren zwei phenolische Substanzen zu erkennen, die beide höhere Rf-Werte als die 4-Hydroxyphenylelessigsäure und die Produkte der fermentativen Oxydation besaßen. Eine dieser Substanzen konnte unter den gleichen Bedingungen wie das Oxydationsprodukt B' der 4-Hydroxyphenylelessigsäure an einer Kieselgelsäule abgetrennt werden. Nach dem Verhalten gegenüber einer Natriumkarbonatlösung, dem UV-Spektrum, dem Schmelzpunkt (Fp. 114°C) besaß diese Substanz andere Eigenschaften als das Oxydationsprodukt B' (Fp. 190-191°C). So wichen auch die gemittelten CH-Werte C: 68,46 % und H: 6,38 % erheblich von denen des Oxydationsproduktes B' ab.

B. Versuche zur Oxydation des Lactucins mit Wasserstoffperoxyd in Gegenwart von Peroxydase

Da im Lactucopikrin Lactucin mit der 4-Hydroxyphenylelessigsäure verestert ist, wurde nun untersucht, ob das Lactucin von Wasserstoffperoxyd in Anwesenheit von Peroxydase angegriffen wird.

H.E. SELL (38) hatte keine Einwirkung von Wasserstoffperoxyd und Peroxydase in geringen Mengen gefunden. Dieses Ergebnis wurde durch andere Versuchsanordnungen von uns erhärtet.

Wie bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure wurden die Spektren der gepufferten Lösungen nach Zusatz von Wasserstoffperoxyd und Ferment beobachtet und darauf konzentriertere Reaktionslösungen chromatographisch untersucht.

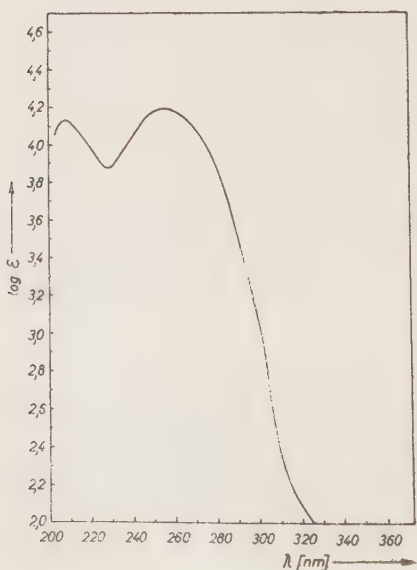


Abb. 9

Spektrum des Lactucins
in 95%igem Äthanol (v/v).

Das Spektrum des Lactucins zeigt im Bereich von 200-320 nm zwei Maxima. (Abb. 9)

Die Maxima und die Werte der molaren Extinktionskoeffizienten wurden mit den Ergebnissen von D.H.R.BARTON und C.R. NARAYANAN (3) und F.WESSELY, R.LORENZ und H.KUHN (51) verglichen (Tabelle 3).

	1. Maximum		2. Maximum	
	nm	ϵ (Liter/mol·cm)	nm	ϵ (Liter/mol·cm)
BARTON			257	14000
WESSELY			255	14790
eigene Werte	208	13420	256	15520

Tabelle 3. Lage der Maxima und ihre molaren Extinktionskoeffizienten für Lactucin in 95%igem Äthanol (v/v).

Nach E.SPÄTH, R.LORENZ und H.KUHN (40) hängt der Schmelzpunkt des Lactucins von experimentellen Bedingungen ab und läßt keine Aussage über die Reinheit der Substanz zu. Deshalb muß zur Beurteilung der Reinheit ein besonderer Wert auf den molaren Extinktionskoeffizienten gelegt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, daß Lactucin von UV- oder Tageslicht angegriffen wird und daß bei dieser photochemischen Reaktion der molare Extinktionskoeffizient abnimmt (28).

Wegen der Labilität gegenüber UV-Strahlen wurden sowohl Lactucin als auch Lactucopikrin vor Tageslicht geschützt. Alle Versuche mit ihnen wurden soweit wie möglich unter Tageslichtausschluß unternommen.

Ebenso wie bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure wurden die Lactucinlösungen bei pH 3, 5 und 7 untersucht. Die Reaktionslösungen für die Versuche zur Oxydation des Lactucins mit Peroxydase und Wasserstoffperoxyd enthielten

$5 \cdot 10^{-5}$ mol Lactucin, $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol Wasserstoffperoxyd und $6,8 \cdot 10^{-10}$ mol Peroxydase. Die Spektren dieser gepufferten Reaktionslösungen zeigten auch nach 5 Stunden gegenüber den Spektren der Lactucinlösungen ohne Wasserstoffperoxyd und Peroxydase keine Veränderung.

Nach der Papierchromatographie mit 5%iger Essigsäure (v/v) (29) und auf einem zweiten Chromatogramm mit Butanol-Pyridin-Dioxan-Wasser 14:4:1:1 (v/v/v/v) war nur ein einheitlicher Fleck des Lactucins zu sehen. Auch nach grober Abschätzung der Fleckengröße einer gleichen, mitgelaufenen Menge authentischen Lactucins war keine Abnahme der Substanz zu erkennen.

Somit war festzustellen, daß bei Lactucin, das eine Vinylgruppe im γ -Lactonring besitzt, keine Polymerisation oder andere Veränderung bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd und Peroxydase eintritt.

Nach M.SUCHY, V.HEROUT und F.SORM (44) polymerisieren die Guaianolide Cynaropicrin, Xanthinin und Ambrosin, die ebenfalls eine Vinylgruppe im γ -Lactonring besitzen, besonders leicht.

Es war festgestellt worden, daß eine Oxydation von Lactucin in dem pH-Bereich 3-7 nicht eingetreten war.

Nun war es interessant, ob in einer Lösung, die in äquimolaren Mengen 4-Hydroxyphenylelessigsäure und Lactucin enthält - wie sie im Ester Lactucopikrin vorliegen - eine Veränderung des Lactucins eintritt.

Die Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure ist unter stöchiometrischen Bedingungen mit zwei Oxydationsäquivalenten Wasserstoffperoxyd abgeschlossen.

Zu einer etwaigen Oxydation des Lactucins waren weitere Wasserstoffperoxydmengen notwendig. Deswegen wurden der Reaktionslösung 5 Oxydationsäquivalente H_2O_2 - bezogen auf die Einwaage des Phenols - zugesetzt.

Nach Zugabe der Peroxydase trat eine Gelbfärbung auf, die auf eine Oxydation des Phenols deutete. Die Lösung blieb aber klar gegenüber den späteren Reaktionslösungen des Esters Lactucopikrin.

Nach der Papierchromatographie dieses Ansatzes auf Whatmanpapier Nr. 1 mit Butanol-Pyridin-Dioxan-Wasser 14:4:1:1 (v/v/v/v) wurde das unveränderte Lactucin, dessen Fleck mit dem einer gleichen Menge authentischer Substanz verglichen wurde, wiedergefunden. 4-Hydroxyphenylessigsäure konnte nicht mehr gefunden werden. Ihre Oxydationsprodukte waren am Start des Chromatogrammes liegengeblieben.

So konnte auch eine Überträgerwirkung der 4-Hydroxyphenylessigsäure gegenüber Lactucin ausgeschlossen werden.

Mit diesen Versuchsanordnungen wurde festgestellt, daß Lactucin in gepufferten Lösungen im pH-Bereich 3-7 und Lactucin in äquimolaren Mengen mit 4-Hydroxyphenylessigsäure bei pH 5 von Wasserstoffperoxyd und Peroxydase nicht angegriffen wird.

C. Untersuchungen über die enzymatische Oxydation des Lactucopikrins durch Peroxydase

In den vorangegangenen beiden Abschnitten wurde die fermentative Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure und des Lactucins behandelt. Nun soll der Ester beider Komponenten - das Lactucopikrin - in dieser Hinsicht untersucht werden.

Es wurde versucht, mit den gleichen Arbeitsmethoden wie dort Ergebnisse über die Oxydation zu erhalten.

1. Das Spektrum des Lactucopikrins

Ähnlich wie das Lactucinspektrum weist das des Lactucopikrins zwei Maxima im Bereich 200-300 nm auf (Abb. 10). Während die Lage der langwelligen Bande gegenüber der des Lactucinspektrums unverändert ist, ist das kurzwellige Ma-

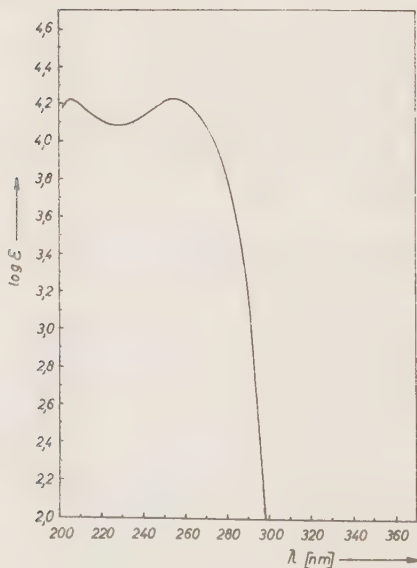


Abb.10
Spektrum des Lactucopikrins in 95%igem Äthanol (v/v) .

ximum dagegen hypsochom verschoben und etwas erhöht. Dieses steht in Übereinstimmung mit der 4-Hydroxyphenylelessigsäure, der Säure des Esters Lactucopikrin, dessen kurzwellige Bande stark hervortritt. (Tabelle 4)

	1. Maximum 205 nm	2. Maximum 256 nm
ϵ (Liter/mol·cm)	16850	16380
E 1% 1cm	411	399

Tabelle 4. Lage der Maxima und ihre molaren Extinktionskoeffizienten für Lactucopikrin in 95%igem Äthanol (v/v).

2. Versuche zur Oxydation des Lactucopikrins

Es wurde gepufferten Lactucopikrinlösungen Wasserstoffperoxyd hinzugesetzt und die Absorptionskurve über mehrere Stunden beobachtet. Auch nach 5 Stunden konnte keine Veränderung des Lactucopikrinspektrums im pH-Bereich 3-7 festgestellt werden.

Den Lösungen wurde daraufhin Peroxydase hinzugesetzt. Nach ungefähr einer Minute trat im untersuchten pH-Bereich 3-7 eine Trübung auf. Die Versuche wurden mit kleinsten Mengen an Wasserstoffperoxyd wie 0,1 und 0,2 Oxydationsäquivalente H_2O_2 und kleineren Peroxydasekonzentrationen wiederholt. Es traten immer wieder Trübungen auf - wenn auch etwas später -, so daß eine Absorptionsveränderung wie bei den Untersuchungen der 4-Hydroxyphenylelessigsäure oder des Lactucins im Spektralphotometer nicht geprüft werden konnte.

Bei der Papierchromatographie der wässerigen Suspensionen der Oxydationsprodukte konnte, obwohl zahlreiche Entwicklungsgemische verwendet wurden, keine Auftrennung erzielt werden. Bei den meisten Laufmitteln blieben die Substanzen

am Start liegen oder zogen sich bis zur Lösungsmittelfront als Streifen hin. Auf den Chromatogrammen, bei denen die Folgeprodukte am Start liegengeblieben waren, ließ sich das restliche, nicht veränderte Lactucopikrin gut erkennen.

Nachdem die ausgefallenen Oxydationsprodukte abzentrifugiert worden waren, zeigten die in der nun klaren Reaktionslösung verbliebenen Substanzen nach Detektieren mit alkalischer 3, 4, 5-Triphenyltetrazoliumchloridlösung (29) dieselbe Verteilung wie vorher.

3. Gewinnung eines Gemisches der Oxydationsprodukte von Lactucopikrin und seine Untersuchung

F.WENDT (50) hatte im Milchsafte der *Lactuca virosa* eine Wasserstoffionenaktivität von pH 5 festgestellt. Bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure war dieser pH-Bereich eingehalten worden. So wurden die folgenden Versuche auch unter diesen Bedingungen ausgeführt.

Nur Gewinnung einer größeren Menge der Oxydationsprodukte war es nötig, die Löslichkeit des Lactucopikrins in den Ansätzen zu erhöhen. Dieses gelang durch einen Zusatz von 5% Methanol. So war es möglich, in 13 l gepufferter Reaktionslösung 2 g Lactucopikrin zu lösen und mit 1 Oxydationsäquivalent Wasserstoffperoxyd in Anwesenheit von Peroxydase zu oxydieren. Die Oxydationsprodukte wurden nach dem Reaktionsende bei niedriger Temperatur abzentrifugiert. Um den gelbweißen Niederschlag von Ausgangssubstanz, Ferment und Puffersubstanzen zu reinigen, wurde er aus Essigsäure - Wasser umgefällt. Papierchromatographisch konnte nach Entwicklung mit 5%iger Essigsäure (v/v) (29) im zweimal umgefällten Niederschlag kein Lactucopikrin mehr nachgewiesen werden.

Das gereinigte Gemisch der Oxydationsprodukte löste sich in Aceton, Dioxan, 80%iger Essigsäure, Formamid, Tetrahydrofuran, Pyridin, Natronlauge und kaum in Natriumkarbonatlösung. Un-

löslich blieb es in Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Äther, Essigester, Wasser und Natriumbikarbonatlösung. Beim Erhitzen mit letzteren Lösungsmitteln zeigte es thermoplastische Eigenschaften.

Die Reaktion mit Zink und Salzsäure, die G.SCHENCK (31) bei Lactucopikrin anwendet und dort eine Rotfärbung ergibt, war bei dem Gemisch negativ.

Bei den weiteren Vergleichen der Oxydationsprodukte mit Lactucopikrin entfärbten beide eine verdünnte Kaliumpermanganatlösung. Nach Auftüpfeln von Lactucopikrinlösungen und Lösungen des Gemisches der Oxydationsprodukte in Dioxan auf Filtrierpapier konnten beide Flecken bei Anwendung des Folin-Ciocalteu-Reagenzes (20) auf Phenole blaugefärbt werden.

Bei einem Versuch zum Nachweis der Esterkonfigurationen mit der Hydroxamsäureprobe (46) zeigten sowohl Lactucopikrin als auch die Oxydationsprodukte eine positive Reaktion. Demnach war es sehr wahrscheinlich, daß bei der Oxydation die Ester- oder Lactongruppierung des Lactucopikrins oder sogar beide in einem oder allen Oxydationsprodukten erhalten geblieben waren.

Für die Hydrolyse des Gemisches der Oxydationsprodukte konnte keine Lauge, Natriumkarbonatlösung oder auch starke Säure verwendet werden, da das Lactucin ihnen gegenüber sehr labil ist (3).

G.SCHENCK, W.SCHREBER und H.GRAF (35) hatten 1940 eine kolorimetrische Bestimmungsmethode für Lactucin und Lactucopikrin ausgearbeitet. Die Autoren behandelten beide Substanzen mit Lauge. Dabei färbten sich die Lösungen gelb.

In Zusammenarbeit mit ihnen schlug A.SCHMITT (37) die Verwendung von äthanolischer oder methanolischer Lauge vor. Hierbei war die Farbtintensität noch größer. Es wurde festgestellt, daß sich Lactucinlösungen weitaus stärker färben als die von Lactucopikrin, da es sich um eine Reaktion der Lauge mit dem Sesquiterpen handelt. Alle Autoren stellten fest, daß die Farbtiefe von Laugenkonzentration, Lösungsmittel, Temperatur, Reaktionszeit und der Konzentration der jeweiligen Substanz abhängt.

Da sich die Oxydationsprodukte des Lactucopikrins in methanolischer Kalilauge unter Gelbfärbung lösten, war es interessant, ob diese Reaktion eine Aussage über den Lactucinanteil des Niederschlages machen konnte. Dazu wurde nach Lösen von Lactucin, Lactucopikrin und der gesamten Oxydationsprodukte in 2,5%iger methanolischer Kalilauge im Spektralphotometer festgestellt, daß sich bei beiden Spektren der zwei Substanzen und auch dem Spektrum des Gemisches im Laufe der Reaktion ein neues Maximum bei 430 nm bildete. Hierbei nahm bei allen drei Lösungen das am Anfang der Reaktion vorhandene Maximum ab, das für Lactucin und Lactucopikrin bei 256 nm und für das Gemisch der Oxydationsprodukte des Lactucopikrins bei 250 nm lag.

Darauf mußte zunächst geklärt werden, ob der Lactucinanteil des Lactucopikrins und seiner Oxydationsprodukte allein mit einer 2,5%igen methanolischen Kalilauge eine gefärbte Lösung bildet oder ob auch die 4-Hydroxyphenylelessigsäure oder deren Folgeprodukte dabei eine Farbreaktion geben, die die Absorption der gefärbten Lösung des Lactucins bei 430 nm stören würde.

So wurden 4-Hydroxyphenylelessigsäure, ihr isoliertes Oxydationsprodukt und das Gemisch der Polymeren dieser Säure mit 2,5%iger methanolischer Kalilauge versetzt und nach einer Stunde die Absorptionen der Lösungen gemessen. Die drei Lösungen enthielten Phenole und so waren ihre Spektren nach der Reaktion bathochrom verschoben. Aber in allen drei farblosen Lösungen waren bei 430 nm keine Absorptionen festzustellen.

Da die Lauge nur mit dem Lactucinanteil des Lactucopikrins und dem der Oxydationsprodukte eine gefärbte Lösung bildet, war nun weiter zu prüfen, ob der molare Extinktionskoeffizient des Lactucopikrins bei 430 nm seinem Lactucinanteil entspricht. Bei mehreren Bestimmungen im Spektralphotometer wurde gefunden, daß der theoretisch berechnete mit dem experimentell ermittelten Wert übereinstimmt.

So stehen die molaren Extinktionskoeffizienten des Lactucopikrins und des Lactucins bei 430 nm im Verhältnis ihrer Molgewichte. Für die Bestimmungen des Gemisches der Oxyda-

tionsprodukte des Lactucopikrins wurde mit einem dreifachen Molekulargewicht des Lactucopikrins gerechnet. (siehe Abschnitt: Versuche zur Identifizierung)

Demnach wurden folgende Lactucinanteile, die aus je drei Messungen gemittelt wurden, für Lactucopikrin und das Gemisch seiner Oxydationsprodukte gefunden. (Tabelle 5)

	Lactucin		Lactucopikrin		Oxydationsprodukte des Lactucopikrins	
Versuchsreihe	ε	Lactucinanteil	ε	Lactucinanteil	ε	Lactucinanteil
1	7750	1,000	5110	0,659	5310	0,685
2	8250	1,000	5500	0,666	5690	0,690
3	9100	1,000	6040	0,663	6260	0,689
Mittelwert		1,000		0,663		0,688
Ber.Lactucinanteile	$\frac{276,0}{276,0}=1,000$		$\frac{276}{410,2}=0,673$		$\frac{828}{1226,6}=0,675$	

Tabelle 5. Bestimmung der Lactucinanteile bei Lactucopikrin und seinen Oxydationsprodukten. Für die Errechnung des Lactucinanteiles im Gemisch der Oxydationsprodukte wurde mit einem dreifachen M des Lactucopikrins gerechnet.

Der molare Extinktionskoeffizient der drei Substanzen hängt stark von der Laugenkonzentration ab. Innerhalb einer Versuchsreihe wurde stets die gleiche Laugenkonzentration verwendet, während die Konzentration bei den drei Versuchsreihen etwas differierte, so daß auch die für eine Substanz gefundenen Werte unterschiedlich sind.

Es ließ sich somit feststellen, daß der Lactucinanteil in den gesamten Oxydationsprodukten in demselben Verhältnis vorliegt wie im Lactucopikrin.

4. Hydrierung und Hydrolyse der Oxydationsprodukte und ihre Charakterisierung

Da festgestellt wurde, daß die Estergruppierung im Gemisch der Oxydationsprodukte erhalten geblieben war und der Lactucinanteil in dem Gemisch der Verbindungen mit dem des Lactucopikrins übereinstimmte, war eine Verseifung zur Aufklärung der Zusammensetzung der Oxydationsprodukte wichtig. Denn erst nach der Hydrolyse der Ester konnten die bei der Oxydation eingetretenen Veränderungen erkannt werden.

Da aber bei einer schnellen und glatten Hydrolyse, die nur im alkalischen Bereich erreicht werden kann, die Labilität des Lactucins störte, mußte dieser Teil im Molekül durch Hydrierung in das stabilere Hexahydrolactucin übergeführt werden.

K.HOLZER und A.ZINKE (23) hatten Lactucopikrin in Äthanol in Gegenwart von Raney-Nickel hydriert und nach der Verseifung Hexahydrolactucinsäure und 4-Hydroxyphenylessigsäure isoliert. Dieser Versuch war nicht ohne weiteres auf das erhaltene Mischpolymerisat übertragbar, da es sich in Äthanol kaum löste. Um bei Raumtemperatur zu hydrieren und dabei die Doppelbindungen nur im Sesquiterpenteil selektiv zu reduzieren, war ein Katalysator mit großer Hydrieraktivität und ein gutes Lösungsmittel für den Niederschlag zu finden.

Bei einer Hydrierung in Eisessig - einem guten Lösungsmittel für den Niederschlag - und in Anwesenheit von Platin war anzunehmen, daß der aromatische Kern und das phenolische Hydroxyl der 4-Hydroxyphenylessigsäure oder ihrer Folgeprodukte teilweise oder ganz reduziert wurden. Raney-Nickel, in dessen Gegenwart lediglich eine Hydrierung des Lactucinanteiles erfolgt, kann in Eisessig nicht verwendet werden, da er in saurer Lösung angegriffen wird. In Dioxan war die Hydrieraktivität selbst von Palladiumtierkohle nicht ausreichend, um eine vollständige Reduzierung des Sesquiterpenteiles zu erreichen. So verwendeten wir den Platinkatalysator nach R.ADAMS (1) in Dioxan-Wasser 90:10.

Die Wasserstoffaufnahme betrug 2,9 mol H_2 /mol Lactucopikrin. Dabei färbte sich im Laufe der Hydrierung die hellgelbe Lösung tiefgrün fluoreszierend. Nach Abfiltrieren des Katalysators, also bei Gegenwart von Luft, verschwand die Fluoreszenz und die gelbe Farbe kehrte wieder zurück.

Diese Färbung war auch schon K.HOLZER und A.ZINKE (23) bei Hydrierungen von Lactucopikrin in Äthanol bei Anwesenheit von Raney Nickel aufgefallen.

Nach Verdampfen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das gelbe, amorphe, hydrierte Gemisch aus Isopropanol umkristallisiert.

Bei der alkalischen Verseifung der hydrierten Oxydationsprodukte von Lactucopikrin wurden 2 mol Natronlauge, bezogen auf das Molekulargewicht von Lactucopikrin, verbraucht. Aus dem Laugenverbrauch ergibt sich ein Äquivalentgewicht von 209,6. Für Hexahydrolactucopikrin läßt sich dieses auf 208,1 berechnen.

Als nun der Hydrolyselösung eine berechnete Menge $\frac{n}{10}$ Salzsäure zur Bildung der Säuren von Hexahydrolactucin oder 4-Hydroxyphenylelessigsäure oder deren Folgeprodukte zugesetzt wurde, hellte sich die Lösung auf und es fielen gelbbraune Flocken aus.

Auf Kieselgelplatten konnte mit dem Laufmittelgemisch Essigester-Hexan-Eisessig 75:24:1 (v/v/v) nach Detektieren mit Folin-Ciocalteul-Reagenz und Natriumkarbonatlösung - wie nach der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure - eine Trennung aller phenolischen Substanzen der Hydrolyselösung beobachtet werden.

Eine noch bessere Auftrennung wurde auf Schleicher und Schüllpapier 2043 b mit dem Entwicklungsgemisch Isopropanol-Ammoniak-Wasser 7:1:3 (v/v/v) erzielt.

Bei beiden Chromatogrammen konnte keine 4-Hydroxyphenylelessigsäure mehr gefunden werden. Außer drei phenolischen Substanzen mit kleineren R_f -Werten als die Säure war Substanz am Startpunkt liegengeblieben. Die drei phenolischen Verbindungen besaßen denselben R_f -Wert wie die drei Oxydationsprodukte der 4-Hydroxyphenylelessigsäure A', B' und C'. Die unveränderte Lage der R_f -Werte deutete darauf hin, daß die Folge-

produkte der 4-Hydroxyphenylelessigsäure bei der Hydrierung nicht reduziert worden sind. Die drei weiteren, nicht bezeichneten, phenolischen Oxydationsprodukte, die bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure in geringen Mengen gefunden wurden, waren hier nicht nachzuweisen.

Um einen Überblick zu gewinnen, in welchen Mengenverhältnissen die Ausgangssubstanz und ihre Oxydationsprodukte nach einer Oxydation mit einem Oxydationsäquivalent H_2O_2 in dem Gemisch enthalten sind, wurde der bei der Oxydation entstehende Niederschlag abzentrifugiert und ohne weitere Reinigung hydriert und hydrolysiert. Die Hydrolyselösung wurde mit einem Reaktionsansatz der 4-Hydroxyphenylelessigsäure, der die gleiche Oxydationsmittelmenge enthielt, auf einem Papierchromatogramm verglichen. Es zeigte sich in den Substanzen als auch im Mengenverhältnis nach Abschätzung auf dem Chromatogramm kein Unterschied.

Somit war festzustellen, daß auf einem Chromatogramm die Folgeprodukte der freien 4-Hydroxyphenylelessigsäure mit denen der veresterten übereinstimmen.

Darauf war der Lactucinanteil des Mischpolymerisats zu untersuchen.

Nach W.REUBERT (29) lassen sich Lactucin- und Lactucopikrinflecken nach einer chromatographischen Trennung mit einer alkalischen 3, 4, 5-Triphenyltetrazoliumchloridlösung rot anfärben.

Da die Reduktion des Triphenyltetrazoliumchlorids an das ungesättigte Sesquiterpen geknüpft ist, mußten alle Versuche mit dieser Substanz bei der Hexahydrolactucinsäure negativ sein. Nach Besprühen von Hexahydrolactucin- und Hexahydrolactucinsäureflecken mit einer Mischung aus Chlorsulfonsäure und Eisessig wurden die Kieselgelplatten 5 Minuten bei $130^{\circ}C$ erhitzt und nach dem Abkühlen unter einer UV-Lampe (365 nm) beobachtet. (48) Beide Substanzen fluoreszierten gelb.

Die Hydrolyselösung der hydrierten Oxydationsprodukte wurde mit 40%igem Methanol (v/v) auf einem Dünnschichtchromatogramm mit Kieselgel entwickelt. Nach Detektieren ließen

sich zwei Flecken identifizieren. Bei dem einen handelte es sich um das Gemisch aller phenolischen Folgeprodukte des 4-Hydroxyphenylelessigsäureanteiles des Esters und bei dem anderen um Hexahydrolactucinsäure. Authentische Hexahydrolactucinsäure lief auf dem Chromatogramm mit.

So kann zusammenfassend gesagt werden, daß bei der Oxydation des Lactucopikrins mit 1 Oxydationsäquivalent H_2O_2 mehrere polymere Produkte gebildet werden. Die Säureanteile A', B' und C' der Substanzen A, B und C stimmen mit den drei in größeren Mengen aufgetretenen Oxydationsprodukten der 4-Hydroxyphenylelessigsäure chromatographisch überein.

5. Isolierung von Hexahydrolactucin aus dem Gemisch der hydrierten Oxydationsprodukte

Zur Identifizierung der chromatographisch nachgewiesenen Hexahydrolactucinsäure wurde diese aus der Hydrolyselösung der gesamten hydrierten Oxydationsprodukte von Lactucopikrin isoliert.

Es handelte sich bei den zu trennenden Substanzen um Polymere der 4-Hydroxyphenylelessigsäure und um die Hexahydrolactucinsäure, Verbindungen, deren wässrige Lösungen stark sauer reagieren.

Da die Reinigung des Lactons leichter ist als die der Hydroxysäure - im allgemeinen tritt beim Umkristallisieren Lactonisierung ein - wurde die Hydrolyselösung mit Salzsäure stark angesäuert und auf $80^\circ C$ erhitzt. Dabei schloß sich der Lactonring des Hexahydrolactucins in kurzer Zeit. Die Lösung wurde dabei durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel/Wasser) kontrolliert. Das Lacton und seine Hydroxysäure besaßen hierbei verschiedene R_f -Werte und wurden mit authentischen Substanzen verglichen.

Nachdem die angesäuerte Lösung im Vakuum konzentriert worden war, wurde sie auf eine Kieselgelsäule gegeben und mit Wasser eluiert. Hierbei wurde eine gute Abtrennung des Hexahydrolactucins erreicht.

Die wässrige Lösung wurde schonend zur Trockne gebracht. Das Rohprodukt wurde aus Essigester umgelöst und zeigte mit Hexahydrolactucin (Fp. 183-184°C), das nach Vorschrift von D.H.R.BARTON und C.R.NARAYANAN (3) hergestellt worden war, keine Schmelzpunktdepression. Die gemischten Substanzen schmolzen bei Fp. 182-183°C.

6. Isolierung einer Fraktion aus dem Gemisch der Oxydationsprodukte

Nach der Hydrolyse der hydrierten Oxydationsprodukte von Lactucopikrin war auf den Chromatogrammen besonders eine phenolische Komponente ihrer Menge nach gegenüber den beiden anderen Substanzen aufgefallen. Es handelte sich um die Komponente B'. So war anzunehmen, daß dieses Produkt - noch mit dem Lactucin als Ester verbunden als Substanz B bezeichnet - einen größeren Teil des Gemisches der Oxydationsprodukte bildete. Bei der Hydrolyse der gesamten Folgeprodukte des Lactucopikrins hatte der phenolische Teil dieser Substanz den gleichen Rf-Wert wie das isolierte Oxydationsprodukt B' der 4-Hydroxyphenylelessigsäure. Auf Grund dieses Ergebnisses wurde eine erneute Auftrennung des Gemisches der Oxydationsprodukte des Lactucopikrins - sie war durch Papierchromatographie nicht zu erreichen gewesen - nunmehr mit Säulenchromatographie versucht.

Die Adsorption der Oxydationsprodukte an aktiviertem Aluminiumoxyd oder Kieselgel war bei Vorversuchen an kleinen Säulen so groß, daß sie bei den verwendeten Lösungsmitteln und auch ihren Mischungen am Start der Säule liegenblieben. Bei Versuchen mit mehr oder weniger polaren Lösungsmitteln an Polyamidsäulen bewährte sich ein Gemisch von Methanol-Tetrahydrofuran im Verhältnis 1:1. So war mit diesem Entwicklungsgemisch an Säulen mit geringer Füllhöhe eine Trennung zu erzielen.

Auch hier war nach der Abtrennung ein Rückstand am Start der Säule liegengeblieben, der sich nur mit Natronlauge unter tiefer Braunfärbung ablöste.

Bei der Auftrennung des Gemisches konnten zwei Zonen mit einer UV-Lampe (Strahlungsmaximum 365 nm) beobachtet werden. Nachdem die erste Zone aufgefangen worden war, verstrich eine geraume Zeit bis die zweite abtropfte. Die Ausbeute dieser zweiten Fraktion war so gering, daß sie nach dem Umkristallisieren nicht weiter charakterisiert wurde.

7. Untersuchung des Oxydationsproduktes B aus dem Gemisch der Oxydationsprodukte und seine Charakterisierung

Der gelbweiße Rückstand der ersten Fraktion, der nach der Entfernung der Lösungsmittel erhalten worden war, wurde mehrmals aus Isopropanol unter großen Verlusten umkristallisiert. Bei den folgenden Untersuchungen wurde die Fraktion als Substanz B identifiziert.

Nach den Bestimmungen mit methanolischer Kalilauge besaß das amorphe Produkt den unveränderten Lactucinanteil in demselben Verhältnis wie im Lactucopikrin. So wurde folgender gemittelter Wert gefunden:

Gefunden:	0,683	Lactucinanteile
Berechnet:	0,675	" (berechnet für ein trimeres Lactucopikrin)

Zur Überprüfung der Reinheit der ersten Fraktion wurde sie unter denselben Bedingungen wie bei dem Gemisch der Oxydationsprodukte hydriert und verseift. Die Wasserstoffaufnahme betrug 3,0 mol H_2 und das bei der Verseifung gefundene Äquivalentgewicht 209,5 (Hexahydrolactucopikrin 208,1).

Der Schmelzpunkt des hydrierten Produktes B lag bei 172° - 174°C. Nach der Hydrolyse der hydrierten Fraktion konnte auf einem Dünnschichtchromatogramm Hexahydrolactucinsäure identifiziert werden.

Ein Papierchromatogramm, das mit einem Gemisch aus Isopropanol-Ammoniak-Wasser 7:1:3 (v/v/v) entwickelt wurde, zeigt

te bei Auftragen von ca. 300 γ der Fraktion einen Fleck ($R_F = 0,30$ Substanz B').

Bei einer Papierchromatographie der verseiften Oxydationsprodukte von Lactucopikrin wurden drei Polymere gefunden, deren Säureanteile A', B', C' detektiert werden konnten. Die drei einzelnen Polymeren des Lactucopikrins waren mit A, B und C bezeichnet worden.

Demnach war bei der Auftrennung der Polymeren A, B und C über eine Polyamidsäule die Substanz B aus dem Gemisch der Oxydationsprodukte isoliert worden.

Die weiteren Untersuchungen wurden mit dem Oxydationsprodukt B durchgeführt.

Die Werte der Elementaranalyse wurden den berechneten des Lactucopikrins und eines trimeren Lactucopikrins gegenübergestellt. Der Berechnung der Werte des trimeren Lactucopikrins wurde zugrundegelegt, daß bei der Polymerisation der Lactucinanteil des Moleküls unverändert geblieben und die 4-Hydroxyphenylelessigsäure in o-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe unter Dehydrierung eine Polymerisation eingegangen war.

Oxydationsprodukt B gefunden:	C:	66,68 %	H:	5,13 %
Trimeres Lactucopikrin ber. :	C:	67,5 %	H:	5,09 %
Lactucopikrin berechnet :	C:	67,35 %	H:	5,4 %

Zur Aufnahme eines Spektrums dieser Substanz mußte ein Lösungsmittel gefunden werden, das die Substanz hinreichend löste und bis ca. 205 nm eine geringe Eigenabsorption besitzt. In Isopropanol p.a., das bis 210 nm transparent ist, war die Löslichkeit gering. Nur durch Erwärmen des Lösungsmittels auf 40°C konnte eine ausreichende Menge des Oxydationsproduktes gelöst werden. Darauf wurde ein Spektrum mit gleicher Menge Lactucopikrin in Isopropanol aufgenommen. (Abb. 11)

Bei einem Vergleich beider Spektren wurde eine Extinktionszunahme im ersten kurzwelligen Maximum des Spektrums des

Oxydationsproduktes festgestellt. Die gleiche Erscheinung wurde bei dem Oxydationsprodukt B' der 4-Hydroxyphenyllessigsäure beim Vergleich mit seinem Monomeren beobachtet. Eine weitere erhöhte Absorption findet man ab 270-300 nm für die beiden Oxydationsprodukte sowohl des Lactucopikrins als auch der 4-Hydroxyphenyllessigsäure gegenüber ihren monomeren Verbindungen.

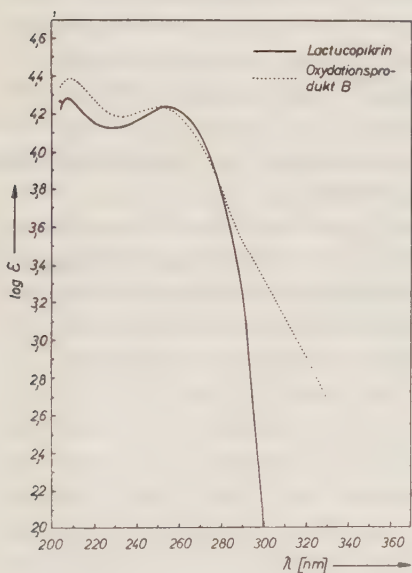


Abb. 11

Spektren des Lactucopikrins und seines Oxydationsproduktes B in Isopropanol.

Bei der Berechnung von ϵ wurde beim Oxydationsprodukt B das Molgewicht der monomeren Ausgangssubstanz zugrundegelegt.

Nach einer vorsichtigen Methylierung der Fraktion B mit Diazomethan wurde ein amorphes Produkt erhalten, von dem ein UV-Spektrum aufgenommen wurde. Die Absorptionskurve zeigte nur noch das kurzwellige Maximum, dem ein starker Abfall folgte. Auch L.DOLEJS, V.HEROUT und F.SORM (14) berichten über einen entsprechenden Verlauf der Adsorptionskurve nach Behandlung von Lactucin mit Diazomethan. Demnach ist anzunehmen, daß durch die Einwirkung des Diazomethans der Lactucinanteil des Oxydationsproduktes verändert worden ist.

Versuche zur Acetylierung, einmal mit Essigsäureanhydrid und Pyridin bei 50°C und das andere Mal nach SPASSOW (39), mißlingen. Auch 4-Hydroxyphenylelessigsäure und deren Oxydationsprodukt B' ließen sich unter diesen Bedingungen nicht acetylieren.

Nach dem Laugenverbrauch bei der Verseifung der hydrierten Fraktion, der Bestimmung des Lactucinanteiles, den CE-Werten, dem Vergleich der Spektren und den chromatographischen Ergebnissen nach der Hydrolyse und ihrem Vergleich mit den Oxydationsprodukten der 4-Hydroxyphenylelessigsäure konnte nur eine polymere Struktur gegenüber Lactucopikrin in Frage kommen.

So war durch eine Molgewichtsbestimmung der Polymerisationsgrad dieser Substanz zu bestimmen.

In einem Dampfdruckosmometer führten wir eine Molgewichtsbestimmung der Substanz B durch. In einer Dioxanlösung wurde ein Molgewicht von 1131 gefunden. Das theoretische Molgewicht für ein trimeres Lactucopikrin beträgt 1227.

III. DISKUSSION

Bei den Versuchen, Lactucin mit Wasserstoffperoxyd und Peroxydase zu oxydieren, wurde keine Veränderung des Lactucins gefunden. Auch bei der Oxydation des Lactucopikrins mit Wasserstoffperoxyd-Peroxydase wurde bei der quantitativen Bestimmung mit methanolischer Kalilauge in den Oxydationsprodukten der unveränderte Lactucinanteil wiedergefunden. Nach der Hydrierung und Hydrolyse dieser Oxydationsprodukte waren auf Chromatogrammen nur die Oxydationsprodukte des 4-Hydroxyphenylelessigsäureanteiles und Hexahydrolactucinsäure zu erkennen. Letztere wurde darauf isoliert und identifiziert.

Demnach wird Lactucin und der Lactucinanteil des Lactucopikrins von geringen Mengen Wasserstoffperoxyd in Anwesenheit von Peroxydase nicht verändert. Unter diesen Bedingungen erfolgt im Lactucopikrin eine Polymerisation des 4-Hydroxyphenylelessigsäureanteiles. Nach einer Verseifung der hydrierten Oxydationsprodukte wurden drei Phenolcarbonsäuren A', B' und C' und Hexahydrolactucinsäure erhalten. Diese drei Säuren A', B' und C' traten auch bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure auf, wie bei einem Vergleich auf einem Papierchromatogramm festzustellen war. Nach der Oxydation sowohl des Lactucopikrins als auch der 4-Hydroxyphenylelessigsäure konnte unter gleichen bestimmten Bedingungen je eine trimere Substanz isoliert werden.

Bei der 4-Hydroxyphenylelessigsäure treten bei Anwesenheit von Peroxydase und Wasserstoffperoxyd Oxydationsprodukte auf, die mit denen anderer einfacher Phenole verglichen werden können.

So gibt H.S.MASON (26) in einer Zusammenfassung über die Oxydationen mit Peroxydasen und Wasserstoffperoxyd eine Reihe von Substraten und ihre identifizierten Oxydationsprodukte an.

Danach entstehen aus Vanillin (6) das 3,3'-Diformyl-, 5,5'-dimethoxy-, 6,6'-dihydroxydiphenyl, aus Kresol

das 2,2'-Dihydroxy-, 5,5'-dimethyldiphenyl, das entsprechende Triphenylderivat und ein Tetrahydrodibenzofuranderivat (52).

Bei der Oxydation des Tyrosins (18) erfolgt eine Dimerisierung durch C-C Bindung in o-Stellung zur Phenolgruppe.

Bei allen erwähnten Substanzen tritt eine Polymerisation in para- oder ortho-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe unter Ausbildung einer C-C Bindung ein.

Nach den heutigen Erkenntnissen (26) treten bei der fermentativen Oxydation der Phenole Radikale auf, die äußerst unbeständig sind und schnell dimerisieren. Die dimeren Produkte können ebenfalls wieder oxydiert werden und mit monomeren oder dimeren Radikalen trimere oder tetramere Substanzen bilden. Der Polymerisationsgrad der entstehenden Substanzen hängt unter anderem von der Löslichkeit der Produkte ab.

Nun sollen die Versuchsergebnisse dieser Arbeit mit den bekannten Reaktionen verglichen werden.

Bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure und des Lactucopikrins mit Wasserstoffperoxyd - Peroxydase treten Polymerisationen auf, wie die Elementaranalysen und die Molekulargewichte der isolierten Oxydationsprodukte zeigen.

Nach der Oxydation werden in dem isolierten Oxydationsprodukt der 4-Hydroxyphenylelessigsäure die unveränderte Carboxymethyl- und die Phenolgruppe wiedergefunden. Dieses konnte durch mehrere Reaktionen, wie Verhalten gegenüber einer Natriumkarbonatlösung, IR-Spektrum, Verschieben der phenolischen Bande im UV-Spektrum nach Zugabe von Alkali, qualitativ bewiesen werden.

Die Ergebnisse wurden durch die Bestimmungen der Methoxylgruppen und des aktiven Wasserstoffes in dem Methylester des Oxydationsproduktes auch quantitativ bewiesen.

Wie das Spektrum und die Phenolnachweise zeigen, ist der aromatische Charakter des Oxydationsproduktes erhalten geblieben. Aus der Bestimmung des aktiven Wasserstoffes ist zu erkennen, daß keine der Phenolgruppen veräthert worden ist.

Durch die Titration bei der Verseifung des Esters (Oxydationsprodukt B des Lactucopikrins) konnte die Anwesenheit aller Carboxylgruppen bewiesen werden. Somit kommen nur C-C Bindungen in den 2- oder 3- oder den gleichwertigen 5- und 6-Stellungen für die Bildung der polymeren Produkte in Frage.

Wie die Beispiele der Oxydationsprodukte zeigen, die nach der Oxydation der oben erwähnten Substrate mit Wasserstoffperoxyd-Peroxydase auftreten, kommt es in keinem Fall zu einer Polymerisation in meta-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe. Dieses würde auch den allgemeinen Substitutionsregeln widersprechen. So bietet sich für die Substitution nur die meta-Stellung zur Carboxymethylgruppe an.

Wie die Bestimmung des aktiven Wasserstoffes in dem Methyl-ester des Oxydationsproduktes zeigt, sind alle drei phenolischen Hydroxylgruppen frei. Eine Ätherbrücke kann demnach nicht gebildet worden sein, so daß die Monomeren nur durch eine C-C Bindung in 3-Stellung zur Carboxymethylgruppe verbunden sein können.

Die Größe dieser Verbindung konnte durch das Molekulargewicht bestimmt werden. Demnach handelt es sich bei dem Oxydationsprodukt B' der 4-Hydroxyphenylessigsäure um eine m-, m-, bis-(5-carboxymethyl-2-hydroxyphenyl) p-Hydroxyphenyl-essigsäure (Abb.12).

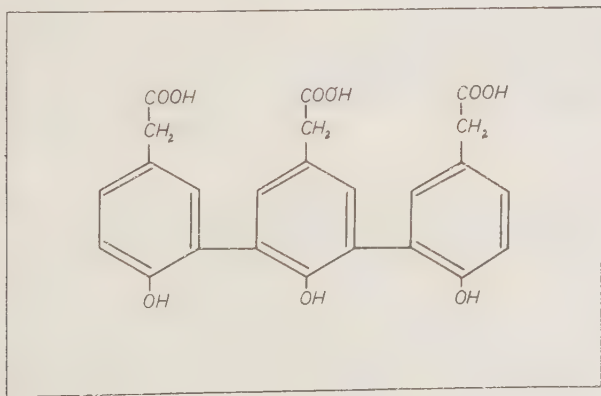


Abb.12

Bei der Oxydation des Lactucopikrins mit Wasserstoffperoxyd-Peroxydase werden Ester gefunden, deren Sesquiterpenanteil einschließlich der Vinylgruppe nicht verändert ist. Auch hier liegen mehrere Beweise vor.

So wurde schon bei dem Versuch, Lactucin mit diesem System zu oxydieren, keine Veränderung des Moleküls festgestellt. Nach der Oxydation des Lactucopikrins kann der Sesquiterpenanteil des Oxydationsproduktes selektiv hydriert werden.

Bei Aufnahme von 2,9 mol Wasserstoff / mol Lactucopikrin werden allein die drei Doppelbindungen des Lactucinanteiles reduziert. Der Phenylkern wird nicht reduziert, denn nach der Hydrolyse der hydrierten Oxydationsprodukte werden die phenolischen Oxydationsprodukte, die schon bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure aufgetreten waren, wiedergefunden.

Weiter gelingt nach der Hydrolyse auch die Isolierung und Identifizierung des Hexahydrolactucins.

Für eine quantitative Analyse wird eine spektrophotometrische Bestimmung herangezogen.

So ist bei dem trimeren Oxydationsprodukt B des Lactucopikrins jede Carboxylgruppe der Substanz B' (Abb.12) mit Lactucin verestert.

IV. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Darstellung der Substanzen

1. Darstellung von 4-Hydroxyphenylelessigsäure

4-Hydroxyphenylelessigsäure wurde aus Phenylelessigsäure über 4-Nitrophenylelessigsäure und 4-Aminophenylelessigsäure hergestellt. (30, 5, 53)

350 g Phenylelessigsäure wurden in 1400 ml konz. Schwefelsäure gelöst und unter Kühlung im Eisbad langsam mit Nitriersäure (350 ml konz. Schwefelsäure und 126 ml Salpetersäure D=1,52) versetzt. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit auf 7 kg Eis gegossen und die abgeschiedene Substanz abgesaugt. Durch nochmaliges Umkristallisieren aus Wasser wurde die schwerlösliche p-Verbindung abgetrennt. Ausbeute 82,5 g 4-Nitrophenylelessigsäure. Schmelzpunkt Fp. 150,5°C. Fp. 152°C nach (5).

Zu 412,5 ml Ammoniak (D=0,95) wurden langsam unter Schütteln 82,5 g 4-Nitrophenylelessigsäure gegeben. Die Mischung wurde in einem Eisbad gekühlt und mit Schwefelwasserstoff gesättigt. Die Lösung von 4-aminophenylelessigsaurem Ammonium wurde erhitzt und der Schwefel abgesaugt. In das heiße Filtrat wurden schnell 33 ml Eisessig eingerührt. Beim Abkühlen kristallisierte die 4-Aminophenylelessigsäure aus, die aus Wasser umkristallisiert wurde. Ausbeute 28,5 g. Schmelzpunkt Fp. 195°C. Fp. 199°C nach (53).

Die 28,5 g 4-Aminophenylelessigsäure wurden in etwa 800 ml 20%iger Schwefelsäure unter Erwärmen gelöst und in die erkaltete Lösung 16,1 g Kaliumnitrit - in etwas Wasser gelöst - zugetropft. Nach einiger Zeit wurde die Lösung bis zum Kochen erhitzt und nach dem Abkühlen mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther wurde verdampft und der Rückstand aus wenig Wasser umkristallisiert. Ausbeute 11,5 g. Die gelbbraunen Kristalle wurden im Vakuum (15 torr, 140°C) sublimiert.

Die Substanz hatte einen Schmelzpunkt von 150-151°C und zeigte keine Schmelzpunktdepression mit einer Handelsware. Fp. 148°C nach (45).

300 γ dieser Substanz wurden auf einem Papierchromatogramm mit Isopropanol-Ammoniak(10%)-Wasser 8:1:1 (v/v/v) (19) entwickelt und mit Folin-Ciocalteu-Reagenz (20) zeigte sich ein einheitlicher Fleck ($R_f = 0.41$).

2. Darstellung des Lactucopikrins

Nach F.WENDT (50) wurden 250 g Latucylpulver (Fa. Knoll AG, Ludwigshafen) mit 1500 g Seesand gut verrieben und 30 Stunden im Soxhletapparat, der durch ein Calciumchloridrohr gegen Luftfeuchtigkeit geschützt war, mit trockenem Chloroform extrahiert. Die im Lösungsmittel abgeschiedenen braunen Massen wurden bei 60°C im Trockenschrank getrocknet. Ausbeute 37 g. Davon wurden je 5 g fein zerrieben, mit Wasser angeschwemmt und zu 5 l Wasser gegeben, das sich kurz vor dem Sieden befand. Auf einem Wasserbad wurde die Suspension 10 Minuten unter Umrühren erhitzt und heiß abfiltriert. Beim langsamen Erkalten trübte sich das Filtrat. Dieses wurde über Nacht in einen Kühlschrank gestellt. Die abgeschiedenen Kristalle wurden abfiltriert und bei 105°C getrocknet. Ausbeute 8,9 g Rohlactucopikrin Fp. 138-139°C. Nach mehrmaligem Umkristallisieren in der 100fachen Menge Wasser wurde ein Schmelzpunkt von Fp. 149-150°C gefunden. In der Literatur sind Schmelzpunkte zwischen Fp. 148-152,5°C angegeben (34,37).

3. Darstellung des Lactucins

E.SPÄTH, G.SCHENCK und W.SCHREBER (41) gewinnen das Lactucin direkt aus dem Latucylpulver. Da aber in der Mutterlauge des Chloroformextraktes bei der Gewinnung von Lactucopikrin noch das Lactucin gelöst ist, wurden die 37 l Mutterlauge schonend im Vakuum bei 15 torr und ca. 30°C auf 6 l konzentriert

und darauf diese Lösung nach den Angaben der Autoren weiter verarbeitet.

Je 1000 ml dieser Lösung wurden mit 10 ml 38%iger HCl versetzt und von der flockigen Fällung abgenutscht. Der Rückstand wurde nochmals mit etwas siedendem Wasser ausgezogen, mit 38%iger Salzsäure versetzt und filtriert. Die vereinigten Filtrate wurden mit 200 g Natriumchlorid versetzt und soviel einer kalt gesättigten Natriumbikarbonatlösung zugegeben, bis die vorher schwach gelbliche Farbe einen braunen Ton angenommen hatte. Diese Flüssigkeit wurde in einen Perforator gegossen und ca. 30 Stunden mit Äther ausgezogen. Im Extraktionskolben schied sich gelbweißes Lactucin ab. Nach Abkühlen im Kühlraum wurde das Lactucin abfiltriert und getrocknet. Aus 37 g Chloroformextrakt wurden 4,8 g Rohlactucin erhalten. Dieses wurde zweimal aus Wasser umkristallisiert und darauf nach der Vorschrift von W.REUBERT (29) endgültig gereinigt.

Dazu wurden jeweils 1g Lactucin in 85 ml heißem Wasser gelöst, mit Aktivkohle versetzt und die heiße Lösung langsam durch eine Aluminiumoxydsäule (3g Aluminiumoxyd sauer, Fa. M. Woelm, Eschwege) gegeben. Das Filtrat wurde langsam abgekühlt und darauf in den Kühlschrank gebracht. Die abgeschiedenen Kristalle wurden noch einmal aus Wasser umkristallisiert und nach dem Trocknen bei 105°C wurde ein Schmelzpunkt von Fp. 224-226°C gefunden.

Zur Überprüfung der Reinheit von Lactucopikrin und Lactucin wurden beide auf zwei aufsteigenden Chromatogrammen in einem Zylinder einmal mit 5%iger Essigsäure (v/v) und das andere Mal mit 40%igem Methanol (v/v) (29) entwickelt. Die Substanzen - es waren ca. 100 μ aufgetragen worden - konnten mit einem Gemisch von 2%iger wässriger 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchloridlösung und 1 n Natronlauge (1+1) detektiert werden. Sowohl Lactucin als auch Lactucopikrin zeigten einen einheitlichen Fleck.

Rf-werte bei 5%iger (v/v) Essigsäure: Lactucin 0,76;
Lactucopikrin 0,5.

Rf-werte bei 40%igem (v/v) Methanol: Lactucin 0,76;
Lactu.pik. 0,64.

Für ein weiteres Kriterium der Reinheit wurde der molare Extinktionskoeffizient in 95%igem Äthanol (v/v) für beide Substanzen bestimmt.

Lactucin $256\text{nm} = 15520.$

Lactucopikrin $256\text{nm} = 16380.$

B. Beschreibung der Versuchsanordnung

1. Allgemeines

a. Peroxydase

Für die enzymatische Oxydation wurde Meerrettichperoxydase der Fa. Boehringer, Mannheim, verwendet. Zur Bestimmung der Aktivität kam eine Methode nach CHANCE und MAEHLI (8) zur Anwendung.

Dabei werden 0,03 ml Fermentlösung (0,5 mg Peroxydase auf 10,0 ml), 0,05 ml einer frisch bereiteten 0,02 m Guajakol-lösung und 2,9 ml Phosphatpuffer pH 7 in einer 1,000 cm Küvette gemischt. Es wird die Extinktion im Spektralphotometer bei 470 nm und 25°C gemessen und darauf 0,02 ml einer 0,04 n Wasserstoffperoxydlösung hinzugesetzt. Es wird die Zeit gemessen, in der sich die Extinktion um 0,050 Einheiten erhöht. Sie betrug in diesem Fall im Mittel 20,1 sec.. Die Fermentkonzentration errechnet sich nach B.CHANCE (9):

$$e \approx \frac{1}{K_4 \cdot a_0} \cdot \frac{\Delta x}{\Delta t} = \frac{68,4}{t} \cdot 10^{-9} \text{ mol/Liter}$$

Dabei ist

e = Enzymkonzentration in mol/Liter.

$K_4 = 3,3 \cdot 10^5 \text{ Liter/mol} \cdot \text{sec. (bei } 25^\circ\text{C)} = \text{Geschwindigkeitskonstante.}$

$a_0 = 3,33 \cdot 10^{-4} \text{ mol/Liter} = \text{Anfangskonzentration des Guajakols.}$

$\Delta x = 7,52 \cdot 10^{-6} \text{ mol/Liter} = \text{Änderung der Wasserstoffperoxydkonzentration während der Messung. Sie entspricht einer gebildeten Reaktionsproduktkonzentration, die eine Extinktionserhöhung um 0,050 Einheiten hervorruft.}$

$\Delta t = \text{Zeit in Sekunden für die Erhöhung der Extinktion um 0,050 Einheiten.}$

Hiernach enthält 1 mg der obigen Trockensubstanz $6,8 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$ aktive Peroxydase. Die Konzentration der Peroxydase in den

einzelnen Reaktionslösungen wird in molarer Konzentration angegeben.

b. Wasserstoffperoxyd

Aus einer ca. 30%igen Perhydrollösung (Merck AG, Darmstadt) wurde eine $\frac{m}{10}$ Wasserstoffperoxydlösung bereitet und im Kühlschrank aufbewahrt. Der Gehalt der Lösung wurde allwöchentlich durch eine Titration mit $\frac{n}{10}$ Kaliumpermanganatlösung bestimmt. Die jeweilig benötigten Mengen wurden dieser Stammlösung entnommen und entsprechend verdünnt. Die Angabe in den Reaktionslösungen wird bei Lactucin in molarer Konzentration angegeben, bei den phenolischen Substanzen - 4-Hydroxyphenylessigsäure und Lactucopikrin - in Oxydationsäquivalenten Wasserstoffperoxyd.

c. Pufferlösungen

Für pH 3 wurde ein Citrat-Salzsäure-Puffer nach SÖRENSEN (2), für pH 5 der Essigsäure-Acetat-Puffer nach MICHAELIS (43) und für pH 7 der Citronensäure-Phosphat-Puffer nach Mc.ILVAINE (2) verwendet. Diese Pufferstammlösungen wurden mit den jeweiligen Reaktionsansätzen im Verhältnis 1:4 verdünnt. Darauf hatten die Reaktionslösungen einen pH von 3, 5 oder 7 (Toleranz $\pm 0,05$ pH Einheiten). Die Wasserstoffionenaktivität wurde mit einer Glaselektrode nachgeprüft.

d. Spektralphotometer

Für die photometrischen Messungen wurde ein Spektralphotometer Modell PMQ II der Firma Carl Zeiss verwendet. Die angegebenen Extinktionen wurden in 1,000 cm Quarzküvetten gemessen oder auf diese Schichtdicke umgerechnet. Die verwendeten Küvetten besaßen untereinander die gleiche Eigenabsorption. Die Vergleichsküvetten wurden durchweg mit einer der Reaktionslösung entsprechenden Blindlösung gefüllt.

Unter ϵ wird der molare Extinktionskoeffizient in Liter/mol.cm und unter E $\frac{1\%}{1\text{cm}}$ die Extinktion bei einer Konzentration von 1,00 g pro 100,0 ml Lösungsmittel und 1 cm Schichtdicke verstanden. Die Temperatur wurde bei den Messungen bei 25°C gehalten.

e. Schmelzpunktapparat

Die Schmelzintervalle wurden durchweg an einem Kofler-Heiztischmikroskop ermittelt.

2. Die Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure durch Wasserstoffperoxyd und Peroxydase

a. Spektrum der 4-Hydroxyphenylelessigsäure

Für das Spektrum der 4-Hydroxyphenylelessigsäure wurde die Substanz bei 80°C und 15 torr über Phosphorpentoxyd getrocknet und darauf 1,200 mg = $2 \cdot 10^{-5}$ mol Säure mit 70%igem Methanol (v/v) in einem Meßkolben zu 25,0 ml gelöst. Hiervon wurden 5 ml entnommen und auf 10,0 ml mit dem Lösungsmittel verdünnt.

b. Stammlösung der 4-Hydroxyphenylelessigsäure

Die Oxydationsversuche, deren Verlauf spektralphotometrisch gemessen werden sollten, wurden in 100,0 ml Meßkolben angesetzt. Dazu wurde eine konzentrierte Stammlösung der 4-Hydroxyphenylelessigsäure verwendet.

152,1 mg 4-Hydroxyphenylelessigsäure ($M = 152,1$) wurden in einem Meßkolben zu 100,0 ml mit bidestilliertem Wasser gelöst. Für die Reaktionsansätze wurden jeweils 2 ml ($2 \cdot 10^{-5}$ mol = 3,04 mg Säure) dieser Lösung verwendet. Diese wurde in einem Kühlraum aufbewahrt und alle 4 Tage frisch bereitet.

Für die Spektren der gepufferten Lösungen wurden 2 ml der Stammlösung mit 20 ml Pufferlösung pH 3, 5 oder 7 versetzt und mit bidestilliertem Wasser zu 100,0 ml aufgefüllt.

c. Reaktionslösung für die Spektralphotometrie

Zu 2 ml Stammlösung der Säure wurden 20 ml Pufferlösung pH 3, 5 oder 7 gegeben.

Für die Zugabe des Wasserstoffperoxyds mußte die $\frac{m}{10}$ Wasserstoffperoxydlösung entsprechend verdünnt werden. Dazu wurden 20 ml letzterer Lösung entnommen und auf 1000,0 ml mit

bidestilliertem Wasser aufgefüllt. 5, 10, 15, 20, 25 ml hiervon entsprechen dann 1, 2, 3, 4 und 5 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 bezogen auf $2 \cdot 10^{-5}$ mol 4-Hydroxyphenylelessigsäure. Die Reaktionslösung wurde auf 100,0 ml verdünnt und mit 0,1 ml Peroxydaselösung = $6,8 \cdot 10^{-10}$ mol Peroxydase versetzt. Das Spektrum wurde nach 3 Stunden gemessen.

d. Verfolgung des zeitlichen Ablaufes der Oxydation

Für diese Versuchsreihe wurde eine konzentriertere Stammlösung der Säure verwendet. Dazu wurden 228,15 mg 4-Hydroxyphenylelessigsäure zu 100,0 ml in bidestilliertem Wasser gelöst.

2 ml dieser Lösung ($3 \cdot 10^{-5}$ mol), 20 ml Pufferlösung, 7,5 oder 15 ml der erwähnten H_2O_2 -Lösung - dieses entspricht 1 oder 2 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 bezogen auf $3 \cdot 10^{-5}$ mol 4-Hydroxyphenylelessigsäure - wurden mit bidestilliertem Wasser zu 100,0 ml aufgefüllt und mit 0,15 ml Peroxydaselösung ($10,2 \cdot 10^{-10}$ mol Peroxydase) versetzt und eine Stoppuhr gestartet.

Die Reaktionslösungen wurden umgeschwenkt und schnell in die Küvetten gefüllt. Jede volle Minute wurde die Extinktion im Minimum des Spektrums (248 nm) gemessen. Nach Ablauf von 20 Min. wurde alle 10 Minuten die Absorption festgestellt. Wenn sich diese über 3 mal 10 Minuten nicht mehr änderte, wurde die Messung abgebrochen.

e. Chromatographie der Oxydationsprodukte

Die für die Chromatographie verwendeten Reaktionsansätze besaßen die 10fache Konzentration, der bei den spektral-photometrischen Messungen benutzten Reaktionslösungen.

Sie hatten folgende Zusammensetzung:

30,4 mg ($20 \cdot 10^{-5}$ mol) 4-Hydroxyphenylelessigsäure, 0,5, 1, 2, 3, 4, oder 5 ml $\frac{\text{m}}{10}$ Wasserstoffperoxydlösung (0,5 - 5 Oxydationsäquivalente H_2O_2) und 2 ml Puffer pH 5 wurden auf 10,0 ml mit Wasser aufgefüllt und mit 0,5 ml Peroxydaselösung ($6,8 \cdot 10^{-9}$ mol Peroxydase) versetzt. Die Reaktionszeit betrug 2 Stunden.

Die Reaktionsansätze wurden durch Papier- und Dünnschichtchromatographie untersucht.

Papierchromatographie:

Nach Auftragen von 0,05 ml des Reaktionsansatzes (das entspricht 152 μ g 4-Hydroxyphenylelessigsäure) auf Schleicher und Schüllpapier 2043 b (58*18 cm) (Fa. Schleicher und Schüll, Einbeck/Hannover) wurden die Chromatogramme 12 Stunden mit dem Entwicklungsgemisch in Ganzglaskammern (11) äquilibriert. Es wurde auf besonders guten Verschuß des Zylinders geachtet. Darauf wurde mit Isopropanol-Ammoniak(10%)-Wasser 7:1:3 (v/v/v) modifiziert nach I.M.HAIS und K.MACEK (19) über 23 Stunden entwickelt. Die getrennten Oxydationsprodukte fluoreszierten stark unter einer UV-Lampe (Strahlungsmaximum 254 nm). Die Flecken der 4-Hydroxyphenylelessigsäure waren dagegen dunkel. Darauf wurden die Substanzen mit Folin-Ciocalteu-Reagenz (20) detektiert.

Dünnschichtchromatographie :

Auf Kieselgelplatten (Kieselgel für Dünnschichtchromatographie, Fa. Woelm, Eschwege) wurden ca. 0,003 ml (ca. 9 μ g 4-Hydroxyphenylelessigsäure) des Reaktionsansatzes aufgetragen und mit Essigester-Hexan-Eisessig 75:24:1 (v/v/v) modifiziert nach E.STAHL (42) entwickelt. Vorher wurde der Essigester gereinigt. Dazu wurde er zuerst zweimal mit einer gesättigten, wässrigen Natriumhydrogencarbonatlösung und darauf mit einer gesättigten Natriumchloridlösung ausgeschüttelt, über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend destilliert (47). Die Substanzen ließen sich wie bei der Papierchromatographie detektieren.

f. Darstellung eines Oxydationsproduktes

9,12 g 4-Hydroxyphenylelessigsäure wurden in 4 Ansätzen oxidiert. Dazu wurden 2,28 g ($1,5 \cdot 10^{-2}$ mol) 4-Hydroxyphenylelessigsäure in 500 ml Wasser gelöst. Dieser Lösung wurden $75 \text{ ml } \frac{\text{m}}{10}$ ($0,75 \cdot 10^{-2}$ mol H_2O_2 = 1 Oxydationsäquivalent H_2O_2) Wasserstoffperoxydlösung und 150 ml Puffer pH 5 hinzugefügt.

Der Ansatz wurde umgerührt und 25 ml Peroxydaselösung

($5,1 \cdot 10^{-7}$ mol Peroxydase) dazugegeben.

Nach zwei Stunden wurde der hellgelbe Reaktionsansatz mit 8 250 ml Essigester ausgeschüttelt. Das Lösungsmittelgemisch wurde mit Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und im Vakuum bei 30°C auf ca. 10 ml eingedampft.

Säulenchromatographie

100 g Kieselgel (Korngröße 0,05-0,2 mm, Fa. Merck AG, Darmstadt) wurden in einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester-Hexan-Eisessig 75:24:1 (v/v/v) suspendiert, in eine 2,7 cm breite Chromatographiesäule 30 cm hoch eingeschlämmt und darauf mit dem Entwicklungsgemisch gut gewaschen.

Die Säulenoberfläche wurde mit einem Filtrierpapier bedeckt und die konzentrierte Essigesterlösung eines Ansatzes auf die Säule gegeben. Es wurde darauf geachtet, daß ca. 40 Tropfen/Min. abliefen. Ungefähr 130 ml wurden aufgefangen bis die nicht oxydierte Säure aus der Säule trat. Diese konnte durch eine Tüpfelreaktion mit der Folinlösung und Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten mit dem gleichen Laufmittelgemisch wie oben festgestellt werden. Darauf wurde das Eluat in einem Fraktionssammler in 3 ml Portionen aufgefangen. Die Fraktionen wurden durch Papierchromatographie mit Isopropanol-Ammoniak-Wasser 7:1:3 (v/v/v) untersucht. Allein die Fraktion B' ($R_f = 0,3$) war in größerer Menge angefallen und wurde näher bestimmt. Ausbeute 550 mg Rohprodukt. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus wenig Wasser wurden 260 mg des Oxydationsproduktes erhalten.

g. Versuche zur Identifizierung des Oxydationsproduktes B' Spektrum des Oxydationsproduktes

Die Substanz wurde bei 70°C eine Stunde über Phosphorpentoxyd bei 15 torr getrocknet und darauf 1,00 mg zu 100,0 ml mit 70%igem Methanol (v/v) gelöst. Zum Vergleich mit der 4-Hydroxyphenylelessigsäure wurde zur Errechnung der Extinktionskoeffizienten mit dem Molgewicht der Ausgangssubstanz gerechnet.

Elementaranalyse^{x)}

Eine Analyse des CH - Gehaltes des Oxydationsproduktes B' ergab die folgenden Werte. Die Substanz wurde hierzu im Hochvakuum bei 50°C getrocknet.

1. Bestimmung	C: 61,96 %	H: 4,81 %
2. Bestimmung	C: 62,10 %	H: 4,64 %
Mittelwert	C: 62,03 %	H: 4,73 %

IR - Spektrum

Um die IR-Spektren der 4-Hydroxyphenylelessigsäure und ihres Oxydationsproduktes B' vergleichen zu können, wurden beide Substanzen 4 Stunden über Phosphorpentoxyd bei 80°C und 15 torr getrocknet und einzeln mit Kaliumbromid feinst verrieben. Die Spektren wurden nach dem Pressen der Kaliumbromid-tabletten in einem Perkin Elmer Spektrophotometer Modell 237 gemessen.

Methoxylgruppenbestimmung

Dazu wurde das Oxydationsprodukt B' in absolutem Methanol gelöst. Dieses wurde über das Magnesiummetholat gewonnen. Der methanolischen Lösung wurde langsam eine ätherische Diazomethanolösung, die nach Gattermann - Wieland hergestellt worden war, zugegeben. Nach ca. 24 Stunden wurden die Lösungsmittel im Vakuum verdampft, der Rückstand nochmals in Methanol aufgenommen und mit der ätherischen Diazomethanolösung versetzt. Nach dem endgültigen Vertreiben der Lösungsmittel blieb eine viskose Flüssigkeit zurück, die 24 Stunden bei 12 torr und 80°C über Calciumchlorid getrocknet wurde. Darauf wurde die Flüssigkeit zur Methoxylgruppen- und Molekulargewichtsbestimmung verwendet. Bei der Methoxylgruppenbestimmung^{x)} wurden folgende Werte für das methylierte Oxydationsprodukt gefunden:

1. Bestimmung	19,91 %
2. Bestimmung	19,97 %
Mittelwert	19,94 %

x) durchgeführt vom Mikroanalytischen Labor A. Bernhardt, Mühlheim/Ruhr.

Elementaranalyse^{x)} des methylierten Oxydationsproduktes B'
Die Flüssigkeit wurde vor der Bestimmung 2 Stunden bei
50°C und 2 torr über Calciumchlorid getrocknet.

1. Bestimmung	C: 64,45 %	H: 5,86 %
2. Bestimmung	C: 64,57 %	H: 5,90 %
Mittelwert	C: 64,51 %	H: 5,88 %

Bestimmung^{x)} des aktiven Wasserstoffes nach Zerewitinoff
Das methylierte Oxydationsprodukt B' wurde wie bei seiner
Elementaranalyse getrocknet, in scharf getrocknetem
Anethol gelöst und mit Methylmagnesiumjodid versetzt. Nach
der entwickelten Methanmenge wurden folgende Werte für den
aktiven Wasserstoff gefunden:

1. und 2. Bestimmung: je 0,72 % akt. H.

Aus dem Verbrauch der eingestellten $\frac{n}{10}$ Methylmagnesiumjodidlösung errechnet sich ein Wert von: 0,732 % akt. H.

Bei einem Molekulargewicht von 494,5 und einem Gehalt von
0,72 % akt. Wasserstoff für das Oxydationsprodukt B' (trimerer
4-Hydroxyphenylelessigsäuremethylester) berechnen sich
3,5 Atome Wasserstoff für diese Verbindung.

Molekulargewichtsbestimmung

Hierzu wurde das gleiche Gerät wie bei der Molekulargewichtsbestimmung des Oxydationsproduktes B des Lactucopikrins verwendet. Abweichend von jener Bestimmung wurde hier Aceton als Lösungsmittel genommen.

Für das methylierte Oxydationsprodukt B' wurde das Molekulargewicht 552 gefunden.

x) durchgeführt vom Mikroanalytischen Labor A. Bernhardt,
Mühlheim/Ruhr.

3. Versuche zur Oxydation des Lactucins durch Wasserstoffperoxyd und Peroxydase

a. Spektrum des Lactucins

Das Lactucin ($M = 276,0$) wurde eine Stunde über Phosphor-pentoxyd bei 80°C und 15 torr getrocknet und darauf 1,38 mg ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$) mit 95%igem Äthanol (v/v) zu 100,0 ml gelöst.

b. Reaktionslösung für spektrophotometrische Messungen

Aus einer methanolischen Stammlösung, die in 25 ml 172,5 mg Lactucin enthielt, wurden 2 ml ($13,8 \text{ mg} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ ml Lactucin}$) entnommen, mit 20 ml Puffer pH 3, 5 oder 7 und mit $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol H}_2\text{O}_2$ versetzt. Darauf wurde die Lösung mit bidestilliertem Wasser auf 100,0 ml verdünnt und ihr 0,1 ml Peroxydase-lösung ($6,8 \cdot 10^{-10} \text{ mol Peroxydase}$) zugegeben. Das Spektrum der Reaktionslösung wurde nach 2 und 5 Stunden gemessen.

c. Papierchromatographie der Reaktionslösung

Die Konzentration der Reaktionslösungen wurde so gewählt, daß 0,1 ml 55% Lactucin enthielten. Dazu wurde die 4fache Konzentration der Reaktionslösung genommen, die zur Messung im Spektralphotometer gedient hatte. Auf den Papierchromatogrammen liefen die gleichen Mengen Lactucin zum Vergleich mit.

Die Reaktionslösungen wurden einmal nach der Methode von W.REUBERT (29) aufsteigend in einem Konservenglas mit 5%iger Essigsäure (v/v) und ein zweites Papierchromatogramm $58 \cdot 18 \text{ cm}$ (Whatmanpapier Nr. 1) absteigend mit Butanol-Pyridin-Dioxan-Wasser 14:4:1:1 (v/v/v/v) (19) entwickelt.

Darauf wurden die Chromatogramme im UV-Licht (Strahlungsmaximum einmal 254 nm, das andere Mal 360 nm) beobachtet und anschließend mit einem Gemisch gleicher Teile 2%iger, wässriger 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchloridlösung und 1 n Natronlauge besprüht. (29)

d. Reaktionslösung mit Lactucin und 4-Hydroxyphenylelessigsäure und ihre Papierchromatographie

Die Lösung enthielt Lactucin und 4-Hydroxyphenylelessigsäure in äquimolaren Mengen, wie sie im Lactucopikrin vorliegen.

Um eine Oxydation des Lactucins zu erreichen, wurde dieser Lösung Wasserstoffperoxyd im Überschuß zugegeben. Die Peroxydasekonzentration wurde unter Berücksichtigung der 10fachen Substratmenge gegenüber den spektrophotometrischen Messungen der 4-Hydroxyphenylelessigsäure im gleichen Verhältnis erhöht.

Zusammensetzung der Reaktionslösung

30,4 mg ($2 \cdot 10^{-4}$ mol) 4-Hydroxyphenylelessigsäure und 55,2 mg ($2 \cdot 10^{-4}$ mol Lactucin) wurden in einem Meßkolben in 3 ml Methanol gelöst. 20 ml Puffer pH 5 und 5 ml $\frac{m}{10}$ Wasserstoffperoxydlösung ($5 \cdot 10^{-4}$ mol H_2O_2 = 5 Oxydationsäquivalente H_2O_2 bezogen auf die 4-Hydroxyphenylelessigsäuremenge) wurden dazugegeben. Der Kolben wurde auf 100,0 ml mit Wasser aufgefüllt und mit 0,5 ml Peroxydaselösung versetzt ($6,8 \cdot 10^{-9}$ mol Peroxydase).

Papierchromatographie

Nach 5 Stunden Reaktionszeit wurde mehrmals 0,1 ml (= 55,2 μ g Lactucin und 30,4 μ g 4-Hydroxyphenylelessigsäure) auf zwei Whatmanpapiere Nr. 1 aufgetragen. Daneben wurden gleiche Substanzmengen Lactucin und Säure aufpipettiert.

Im Ganzglaskammern (11) wurde, nachdem 14 Stunden äquilibriert worden war, mit Butanol-Pyridin-Dioxan-Wasser 14:4:1:1 (v/v/v/v) (19) absteigend entwickelt. Das eine der getrockneten Chromatogramme wurde darauf mit einer alkalischen 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchloridlösung (29) und das andere Chromatogramm mit diazotierter Sulfanilsäure in 10%iger Natriumkarbonatlösung (12) detektiert.

Lactucin (R_f = 0,72) besaß ungefähr die gleiche Fleckengröße wie eine gleiche Menge authentischer Substanz. 4-Hydroxyphenylelessigsäure war nicht mehr nachzuweisen. Ihre Oxydationsprodukte waren am Start liegengeblieben, sie färbten

sich mit diazotierter Sulfanilsäure rotorange.

4. Untersuchungen über die enzymatische Oxydation des Lactucopikrins

a. Spektrum des Lactucopikrins

Lactucopikrin wurde über Phosphorpentoxyd bei 15 torr und 80°C 1 Stunde getrocknet. 1,230 mg ($3 \cdot 10^{-6}$ mol, $M = 410,2$) Lactucopikrin wurden mit 95%igem Äthanol (v/v) zu 100,0 ml gelöst.

b. Reaktionslösung für die spektralphotometrische Untersuchung

Einer Lactucopikrinstantmlösung, die in 25 ml Methanol 15,37 mg Lactucopikrin gelöst enthielt, wurden 2 ml ($1,23 \text{ mg} = 3 \cdot 10^{-6}$ mol Lactucopikrin) entnommen und mit 20 ml Puffer pH 3, 5 oder 7 vermischt. Für ein Oxydationsäquivalent Wasserstoffperoxyd wurden 15,0 ml ($1,5 \cdot 10^{-6}$ mol $\text{H}_2\text{O}_2 = 1$ Oxydationsäquivalent H_2O_2) einer $\frac{\text{m}}{10000}$ Wasserstoffperoxydlösung verwendet. Nach Zugabe der H_2O_2 -Lösung wurde mit Wasser zu 100,0 ml verdünnt und darauf 0,1 ml Peroxydaselösung ($6,8 \cdot 10^{-10}$ mol Peroxydase) zugesetzt.

Das Spektrum dieser Reaktionslösung konnte nicht gemessen werden, da die Lösung sich sehr schnell trübte.

c. Reaktionsansatz zur Gewinnung der Oxydationsprodukte

Eine Mischung von 24,4 ml $\frac{\text{m}}{10}$ Wasserstoffperoxyd ($2,44 \cdot 10^{-3}$ mol $\text{H}_2\text{O}_2 = 1$ Oxydationsäquivalent) und 2690 ml Puffer pH 5 in 10 l Wasser wurde unter Umschwenken zu einer Lösung von 2,00 g ($4,88 \cdot 10^{-3}$ mol) Lactucopikrin in 700 ml Methanol gegeben. Darauf wurden 25 ml Peroxydaselösung ($11,1 \cdot 10^{-7}$ mol Peroxydase) hinzugesetzt. Die Reaktionslösung trübte sich schnell und wurde vor Licht geschützt bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach 45 Stunden wurde der Niederschlag abzentrifugiert, zweimal gründlich mit Wasser verrieben und darauf zentrifugiert. Die noch feuchte Paste wurde in einem Eindampfgerät nach E.HECKER und P.KARLSON (21) bei 30°C und 15 torr zur Trockne gebracht. Ausbeute: 1,44 g.

Zur Entfernung des noch vorhandenen Lactucopikrins wurde eine gesättigte Lösung der Oxydationsprodukte in 80%iger Essigsäure mit Wasser versetzt und der Niederschlag abzentrifugiert.

Nachdem die Oxydationsprodukte ein zweites Mal umgefällt worden waren, konnte auf einem Papierchromatogramm kein Lactucopikrin mehr nachgewiesen werden. Laufmittel: 5%ige Essigsäure (v/v), Detektion: 2%ige 2, 3, 5-Triphenyl-tetrazoliumchloridlösung in 1 n Natronlauge (1:1) nach W.REUBERT (29). Papier: Schleicher und Schüll 2043 b.

d. Hydroxamsäureprobe

Nach der Verseifung eines Esters wird mit Hydroxylamin eine Hydroxamsäure gebildet. Diese Säure gibt mit Eisen(III)-chlorid eine tiefrote bis rotviolette Farbreaktion.

a) Dazu wurde eine Spatelspitze des Gemisches der Oxydationsprodukte in 1 ml 96%igem Äthanol erhitzt. Nach Zusatz von 1 ml n Salzsäure und einem Tropfen einer 10%igen Eisen(III)-chloridlösung war die Farbe des Gemisches gelb.

b) In einem zweiten Reagenzglas wurde eine Spatelspitze des Gemisches in einer Lösung von 1 ml einer 0,5 n Hydroxylammoniumchloridlösung in 96%igem Äthanol erwärmt. 0,2 ml 6 n Natriumhydroxydlösung wurden zugesetzt und bis zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 2 ml n HCl, 2 ml Äthanol und 1 Tropfen einer 10%igen Eisen(III)-chloridlösung zugegeben. Dabei färbte sich die Lösung rot gegenüber der von a).

Bei einer Wiederholung der Probe b) ohne Zusatz von Natriumhydroxyd blieb die Lösung gelb.

e. Reaktion von Lactucin, Lactucopikrin und dem Gemisch der Oxydationsprodukte des Lactucopikrins mit einer methanollischen Kalilauge

Dazu wurden ca. 7,5 g Kaliumhydroxyd rotuli p.a. (Fa. Merck AG, Darmstadt) in 5 ml Wasser gelöst und zu 250,0 ml mit Methanol (von Aldehyden gereinigt) aufgefüllt und einen Tag stehen gelassen. Die Lösung blieb klar und farblos.

Drei 10,0 ml Melkolben wurden bei 20°C mit der methanolischen Kalilauge gefüllt. Lactucin, Lactucopikrin und das Gemisch der Oxydationsprodukte wurden bei 80°C und 15 torr eine Stunde über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Für die zwei Substanzen und das Gemisch wurden je drei Bestimmungen durchgeführt. Die Lösungen wurden in 0,500 cm Küvetten gemessen. Wegen der geringeren Schichtdicke konnte die Einwaage erhöht und so ein Wägefehler klein gehalten werden. Nach Zugabe der Substanzen wurden die Lösungen in einem Thermostaten bei 25°C aufbewahrt und nach genau 60 Minuten (Stoppuhr) im Spektralphotometer bei 430 nm gegen einen Blindwert gemessen.

Spaltbreite: 0,01 Meßtemperatur: 25°C.

f. Hydrierung der Oxydationsprodukte

Bei der Hydrierung der Oxydationsprodukte des Lactucopikrins wurde als Lösungsmittel ein Gemisch von gereinigtem Dioxan und Wasser 90:10 (v/v) und der Platinkatalysator nach R. ADAMS (1), der nach der Vorschrift nach GATTERMANN - WIELAND (17) bereitet worden war, verwendet. Das Dioxan war nach den Angaben von K. HESS und H. FRAHM (22) gereinigt worden.

Für die Hydrierung wurde die Apparatur nach Theilacker (Fz. Edmund Bühler, Tübingen) mit 50 ml Glasbüretten benutzt. Der Wasserstoff wurde einer Stahlflasche entnommen und zur Reinigung langsam durch eine 1%ige Kaliumpermanganatlösung geschickt.

Hydrierung

In eine Schüttelente mit 100 ml Volumen wurden 42,3 mg PtO₂ mit 10 ml Dioxan-Wasser 90:10 (v/v) hineingespült und das Gefäß durch eine Wasserstrahlpumpe evakuiert. Darauf wurde die Schüttelente aus den Glasbüretten mit Wasserstoff gefüllt und der Wasserstoff langsam aus der Ente entweichen gelassen. Die Schüttelente und die Hydrierapparatur wurden solange mit Wasserstoff durchspült bis die Knallgasprobe negativ war. Darauf wurde das Platinoxyd unter Rütteln

des Gefäßes reduziert. Nachdem das nun schwammig-flockige Platin über eine halbe Stunde keinen Wasserstoff mehr aufnahm, wurde evakuiert und 219 mg des gereinigten Niederschlages in 30 ml des Lösungsmittelgemisches gelöst zugegeben. Darauf wurde wie angegeben weitergearbeitet. Die gelbe Lösung nahm am Anfang schnell Wasserstoff auf und fluoreszierte gegen Ende der Reaktion grün. Nach 4 Stunden wurde ein Verbrauch von 38,2 ml H_2 ($T = 294^\circ K$; $p = 766,3$ torr) festgestellt. Darüber wurde eine halbe Stunde kein Wasserstoff mehr aufgenommen. Die Schüttelente wurde nun evakuiert und die Lösung nach einigem Stehen durch eine Fritte vom Katalysator getrennt. Darauf war die Lösung wieder gelb. Sie wurde in einem Rotationsverdampfer bei 15 torr und $30^\circ C$ zur Trockne gebracht.

Berechnung des Wasserstoffverbrauchs in mol Wasserstoff

Zur Berechnung des Wasserstoffverbrauches wurde, da es sich um Polymere des Lactucopikrins handelt, mit dem Molekulargewicht des Lactucopikrins $M = 410,2$ gerechnet.

Einwaage	219 mg
Verbrauch an H_2 bei $21^\circ C$ und 766,3 torr	38,2 ml H_2
Barometerdruck bei $21^\circ C$ Raumtemp.	766,3 torr
Fadenkorrektur der Hg-Säule (24)	- 2,7 torr
Dampfdruck des Wassers bei Raumtemp. $21^\circ C$ (24)	- 18,7 torr
	744,9 torr

Korrigierter Barometerdruck p 744,9 torr
 Abs. Temperatur der Reaktionslösung T $294^\circ K$
 Der Wasserstoffverbrauch beträgt dann für ein mol Lactucopikrin auf Normalbedingungen (760 torr, $0^\circ C$) umgerechnet:

$$V = \frac{v \cdot T_o \cdot p \cdot M_{Lp}}{V_o \cdot T \cdot p_o \cdot a}$$

$$V = \frac{38,2 \cdot 273 \cdot 744,9 \cdot 410,2}{22415 \cdot 294 \cdot 760 \cdot 0,219}$$

$$V = 2,91 \text{ mol } H_2 / \text{mol Lactucopikrin}$$

g. Hydrolyse des hydrierten Gemisches der Oxydationsprodukte und seine Chromatographie

Das Gemisch der hydrierten Oxydationsprodukte wurde zweimal aus Isopropanol umkristallisiert.

Zur Hydrolyse wurden 92 mg des Gemisches mit 10 ml $\frac{n}{10}$ Natronlauge in siedendem Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt. Die Oxydationsprodukte lösten sich langsam und färbten die Lösung gelb. Nebenher wurde ein Blindwert zur Bestimmung des Faktors der $\frac{n}{10}$ NaOH bestimmt. Nach 2 Stunden wurden 5,41 ml $\frac{n}{10}$ Salzsäure (F=1,000) gegen Phenolphthalein zurückgemessen (23). Trotz der nun braun gefärbten Lösung war der Umschlagspunkt gut zu sehen.

Berechnung:

Für den Blindwert wurden 9,81 ml, für den Hauptversuch 5,41 ml $\frac{n}{10}$ HCl (F=1,000) verbraucht. Daraus ergibt sich, daß für die Verseifung 4,40 ml $\frac{n}{10}$ NaOH = 17,6 mg NaOH benötigt wurden. Demnach beträgt das Äquivalentgewicht:

$$x = \frac{40 \cdot 0,092}{0,0176}$$

$$x = 209,1$$

Der berechnete Wert für Hexahydrolactucopikrin beträgt 208,1.

Die Hydrolyselösung wurde mit der berechneten Menge $\frac{n}{10}$ Salzsäure F= 1,000 (4,49 ml) zur Überführung der Natriumsalze in die freien Säuren der Hexahydrolactucinsäure und der 4-Hydroxyphenylelessigsäure oder deren Folgeprodukte angesäuert. Dabei hellte sich die Lösung stark auf. Nach kurzer Zeit fielen braungelbe Flocken aus.

Zur Charakterisierung der phenolischen Folgeprodukte der 4-Hydroxyphenylelessigsäure wurde die angesäuerte Lösung nach den gleichen Methoden chromatographisch untersucht, wie sie schon bei den Oxydationsprodukten der 4-Hydroxyphenylelessigsäure benutzt worden waren.

Zur Identifizierung der Hexahydrolactucinsäure wurden auf

einem Dünnschichtchromatogramm mit Kieselgel (Kieselgel für Dünnschichtchromatographie, Fa. Woelm, Eschwege) auf mehreren Startpunkten die angesäuerte Hydrolyselösung und authentische Hexahydrolactucinsäure aufgetragen. Das Chromatogramm wurde darauf mit Wasser entwickelt und getrocknet. Die linke und rechte Plattenhälfte wurden getrennt detektiert. So wurde die eine Seite mit Chlorsulfonsäure-Eisessig besprüht. Hierzu wurden 5 ml frisch destillierte Chlorsulfonsäure langsam unter Eiskühlung in 10 ml Eisessig gegeben (48). Das Chromatogramm wurde darauf 5 Minuten in einem Trockenschrank bei 130°C aufbewahrt und darauf unter einer UV-Lampe (Strahlungsmaximum 365 nm) betrachtet. Es zeigten sich über den Startflecken der Hydrolyselösung zwei Flecken. Der eine konnte nach Vergleich mit der authentischen Substanz der Hexahydrolactucinsäure zugeordnet werden. Der zweite Fleck konnte - nachdem die andere Hälfte des Chromatogrammes mit Folin-Ciocalteu-Reagenz besprüht worden war - als Gemisch aller phenolischen Substanzen identifiziert werden. Hexahydrolactucinsäure reagiert nicht mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz. Durch diese Methode ließen sich auch Hexahydrolactucinsäure und Hexahydrolactucin voneinander trennen. Letzteres gab die gleiche Reaktion mit Chlorsulfonsäure-Eisessig.

b. Isolierung des Hexahydrolactucins

Die in der Hydrolyselösung nachgewiesene Hexahydrolactucinsäure konnte als Hexahydrolactucin isoliert werden.

Da die Reinigung des Lactons einfacher ist als die der Hydroxysäure, wurde die Hexahydrolactucinsäure in ihr Lacton übergeführt.

Dazu wurde die Hydrolyselösung, die die gesamten Oxydationsprodukte des Lactucopikrins enthielt, mit Salzsäure auf pH 1 gebracht und im Wasserbad bei 80°C erhitzt. Unterdessen wurden Proben entnommen und durch Dünnschichtchromatographie (wie bei der Identifizierung der Hexahydrolactucinsäure) der Anteil des Lactons abgeschätzt. Schon nach ca. 3 Minuten war das Gleichgewicht vollständig zum Lacton verschoben.

Die Lösung, die noch ca. 90 mg eines Gemisches des Hexahydrolactucins und der Folgeprodukte der 4-Hydroxyphenyl-essigsäure enthielt, wurde schonend auf 2 ml konzentriert und an einer Kieselgelsäule chromatographiert.

Dazu wurden 5 g Kieselgel (Korngröße 0,05 - 0,2 mm, Fa. Merck AG, Darmstadt) mit Wasser angeschlämmt und in eine Chromatographiesäule von 1,5 cm lichter Weite gegeben und mit Wasser gewaschen. Nachdem die Lösung aufgetragen worden war, wurde langsam mit Wasser eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen auf einem Fraktionssammler getrennt aufgefangen und durch Dünnschichtchromatographie analysiert.

Die wässrige Lösung des Hexahydrolactucins wurde im Vakuum eingedampft. Ausbeute 22 mg Rohprodukt.

Dieses wurde zweimal aus sehr wenig Essigester umgelöst und besaß darauf einen Schmelzpunkt von Fp. 179-180°C.

Ein Mischschmelzpunkt mit einer Substanz, die nach Angaben von D.H.R.BARTON und C.R.NARAYANAN (3) hergestellt worden war (Fp. 183-184°C), zeigte einen Fp. 182-183°C.

1. Isolierung einer Fraktion aus dem Gemisch der Oxydationsprodukte

Mit einer Mischung von Tetrahydrofuran und Methanol (1:1) konnten die Oxydationsprodukte des Lactucopikrins an einer Polyamidsäule aufgetrennt werden.

Dazu wurde das Tetrahydrofuran vorher mit Kupfer(I)-chlorid unter Rückfluß gekocht und darauf abdestilliert. Das gewonnene Tetrahydrofuran war frei von Peroxyden, wie eine Probe mit Vanadin-Schwefelsäure bewies (13).

Chromatographie

Polyamid (PP 15 SP, BASF Ludwigshafen, Rhein) wurde mit gleichen Teilen Methanol und Tetrahydrofuran angeschlämmt und nach 5 stündigem Stehen in drei Chromatographiesäulen mit 2,6 cm lichter Weite 6 cm hoch gefüllt. Die Polyamidsäule wurde mit dem Lösungsmittelgemisch längere Zeit gewaschen und danach mit einem Stück Filtrierpapier bedeckt.

Drei konzentrierte Lösungen von je 300 mg des Gemisches der Oxydationsprodukte des Lactucopikrins in Methanol-

Tetrahydrofuran (1:1) wurden auf je eine Säule gegeben. Die Trennung wurde darauf mit einer UV-Lampe (Strahlungsmaximum 365 nm) beobachtet. Es trennte sich nach kurzer Zeit eine Zone ab, die aufgefangen wurde. Eine zweite, sehr viel kleinere Fraktion trat erst viel später aus der Säule heraus.

Die erste Fraktion der drei Säulen wurde sofort im Vakuum zur Trockne gebracht. Ausbeute 720 mg. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Isopropanol unter großen Verlusten umkristallisiert. Die amorphen Partikel konnten nur durch Zentrifugieren vom Lösungsmittel getrennt werden. Nach einer Umfällung aus Eisessig/Wasser schieden sich voluminöse Flocken ab. Diese wurden auf einer Fritte gesammelt und über festem Kaliumhydroxyd im Vakuumexsikkator getrocknet. Ausbeute 242 mg.

j. Untersuchung des Oxydationsproduktes B aus dem Gemisch der Oxydationsprodukte und seine Charakterisierung

Quantitative Bestimmung des Lactucinanteiles

Diese Bestimmung wurde wie bei der des Lactucinanteiles im Gemisch der Oxydationsprodukte ausgeführt. Dazu wurden in drei Reihenbestimmungen Lactucin, Lactucopikrin, das Gemisch der Oxydationsprodukte und nun auch die 1. Fraktion dieses Gemisches untersucht.

Hydrierung und Hydrolyse des Oxydationsproduktes B
120,2 mg des Oxydationsproduktes wurden in Dioxan-Wasser 90:10 (v/v) bei Anwesenheit von 50 mg PtO_2 in der gleichen Apparatur wie beim Gemisch der Oxydationsprodukte hydriert. Die Lösung nahm bei einem korrigierten Barometerdruck von 735,5 torr und einer Temperatur von 22°C 22 ml Wasserstoff auf. Bei Errechnung des Wasserstoffverbrauches wurde das Molekulargewicht des Lactucopikrins zugrundegelegt.

$$V = \frac{v \cdot T_o \cdot p \cdot M_{Lp}}{V_o \cdot T \cdot p_o \cdot a}$$

$$V = \frac{22,0 \cdot 273 \cdot 735,5 \cdot 410,2}{295 \cdot 760 \cdot 22415 \cdot 0,120}$$

$$V = 3,0 \text{ mol H}_2/\text{mol Lactucopikrin}$$

Zur Verseifung wurden 55,3 mg des hydrierten Oxydationsproduktes B mit 10 ml $\frac{n}{10}$ NaOH im siedenden Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt. Nach 2 Stunden wurden für einen Blindwert 9,79 ml, für den Hauptversuch 7,15 ml $\frac{n}{10}$ HCl (F=1,000) zurücktitriert. Danach wurden 2,64 ml $\frac{n}{10}$ NaOH = 10,56 mg NaOH zur Verseifung des hydrierten Oxydationsproduktes benötigt.

Das Äquivalentgewicht beträgt demnach:

$$x = \frac{40 \cdot 0,0553}{0,01056}$$

$$x = 209,5$$

Elementaranalyse^{x)}:

Nach der Trocknung des Oxydationsproduktes B bei 80°C im Hochvakuum ergaben sich folgende Werte:

Oxydationsprodukt B gefunden	C: 66,68 %	H: 5,13 %
Trimeres Lactucopikrin ber.	C: 63,75 %	H: 4,46 %
Lactucopikrin berechnet	C: 67,3 %	H: 5,4 %

Spektrum des Oxydationsproduktes

Das Oxydationsprodukt wurde bei 80°C und 15 torr 1 Stunde über Phosphorpentoxyd getrocknet und darauf 1,274 mg der Substanz in 100,0 ml Isopropanol p.a. nach Erwärmen bei 40°C und unter Umschwenken gelöst.

Molekulargewichtsbestimmung

In einem Dampfdruckosmometer der Firma Mechrolab Inc. Mountain View, Calif., USA, Modell A 301 wurden die Temperaturdifferenzen verschieden konzentrierter Benzillösungen in Dioxan in einer mit Lösungsmitteldampf gesättigten Atmosphäre gegen das reine Lösungsmittel gemessen.

Die Temperaturdifferenzen wurden gegen die Molarität dieser Lösungen aufgetragen und zu einer Eichgeraden verbunden.

Darauf wurden die Temperaturdifferenzen der Lösung des Oxydationsproduktes B in Dioxan gegen das reine Lösungsmittel bestimmt und mit Hilfe der Eichgeraden das Molekulargewicht zu 1131 berechnet.

x) durchgeführt vom Mikroanalytischen Labor A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde das Verhalten des Lactucopikrins - eines Inhaltsstoffes der *Lactuca virosa* - gegenüber Peroxydase und Wasserstoffperoxyd untersucht.

Dazu wurde das Reaktionsvermögen der einzelnen Komponenten des Lactucopikrins, der 4-Hydroxyphenylelessigsäure und des Lactucins, zunächst in dieser Hinsicht untersucht.

Hierbei konnte eine Oxydation des Lactucins durch das Ferment und Wasserstoffperoxyd nicht gefunden werden. Auch bei Anwesenheit von 4-Hydroxyphenylelessigsäure in diesen Lösungen wurde das Lactucin nicht verändert. So kann auch eine Überträgerwirkung der 4-Hydroxyphenylelessigsäure gegenüber Lactucin ausgeschlossen werden.

Bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure mit Wasserstoffperoxyd und Peroxydase konnte in gepufferten Lösungen bei pH 3, 5 und 7 spektralphotometrisch eine Veränderung des Spektrums des Substrates festgestellt werden. Der Reaktionsablauf war bei pH 5 am schnellsten. Zur vollständigen Oxydation wurden 2 Oxydationsäquivalente Wasserstoffperoxyd pro mol Phenol verbraucht. Die Ergebnisse der spektralphotometrischen Untersuchungen konnten durch Papier- und Dünnschichtchromatographie bestätigt werden. Das chromatographische Verhalten der auftretenden Oxydationsprodukte deutete auf polymere Substanzen hin. Nach der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure mit 1 Oxydationsäquivalent Wasserstoffperoxyd konnte in geringer Ausbeute eine trimere Substanz isoliert werden.

Die bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure mit Eisen(III)-chlorid gebildeten Substanzen stimmen auf einem Papierchromatogramm nicht mit denen bei der fermentativen Oxydation gebildeten Produkten überein.

Bei der Oxydation des Esters Lactucopikrin mit Wasserstoffperoxyd und Peroxydase wurden in Wasser nicht lösliche Oxydationsprodukte erhalten. Anschließend wurde durch eine quantitative Bestimmung mit methanolischer Kalilauge festgestellt, daß der Lactucinanteil nach der Oxydation unver-

ändert geblieben war. Die Hydrolyse der Oxydationsprodukte war erst nach der selektiven Hydrierung des Sesquiterpenanteiles möglich.

Dünnschichtchromatographisch konnte das erwartete Hexahydrolactucin nachgewiesen und anschließend aus der Hydrolyselösung isoliert werden. Dieses wurde durch einen Mischschmelzpunkt mit authentischer Substanz als solches identifiziert. Die in der Hydrolyselösung enthaltenen Oxydationsprodukte des Hydroxyphenylelessigsäureanteiles wurden papierchromatographisch mit denen bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure erhaltenen verglichen. Dabei hatten die Oxydationsprodukte den gleichen Rf-Wert und zeigten Übereinstimmung in ihrem Verhalten gegenüber Folin-Ciocalteu-Reagenz. Wie bei der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure konnte bei Zusatz von 1 Oxydationsäquivalent Wasserstoffperoxyd zu gepufferten Lactucopikrinlösungen in Anwesenheit von Peroxydase eine trimere Substanz isoliert werden. Der Säureanteil dieses polymeren Esters ist mit dem trimeren Oxydationsprodukt der 4-Hydroxyphenylelessigsäure auf Chromatogrammen identisch.

Abschließend wurden die Ergebnisse der Oxydation der 4-Hydroxyphenylelessigsäure mit Peroxydase-Wasserstoffperoxyd mit bekannten Reaktionsmechanismen dieses Oxydationssystems verglichen. Hierbei wurde Übereinstimmung festgestellt und anhand der Ergebnisse Strukturformeln für die trimeren Oxydationsprodukte der 4-Hydroxyphenylelessigsäure und des Lactucopikrins vorgeschlagen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Adams, R., J. Amer. chem. Soc. 45, 2171 (1923)
- 2) d'Ans, J. und Iax, E.,
Taschenbuch für Chemiker und Physiker,
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Hei-
delberg (1949)
- 3) Barton, D. H. R. und Narayanan, C. R.,
J. chem. Soc. (London) 963 (1958)
- 4) Bauer, K. H. und Brunner, K.,
Pharmaz. Zentralhalle Deutschland
39, 598 (1936)
- 5) Borsche, W., Chem. Ber. 42, 3596 (1909)
- 6) Bourquelot, E. und Marchadier, H.,
C. R. hebdomadaire des Seances Acad. Sci. 138, 1432
(1904)
- 7) Bowden, K. und Reece, Ch.,
J. chem. Soc. (London) 2249 (1950)
- 8) Chance, B. und Maehly A. C.
in Methods of Enzymology Bd. II, S. 770,
herausgegeben von S. P. Colowick und
Kaplan H. O., Academic Press, New York
(1955)
- 9) Chance, B., Advances in Enzymology 12, 153 (1951)
- 10) Coggeshall, N. und Lang, E. M.,
J. Amer. chem. Soc. 70, 3283 (1948)
- 11) Cramer, F., "Papierchromatographie", 4. Aufl., S. 48,
Abb. 25, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
(1958)
- 12) Cramer, F., "Papierchromatographie" 4. Aufl., S. 149,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1958)
- 13) Deutsches Arzneibuch,
6. Ausgabe, S. 778, R. v. Deckers Verlag,
Berlin (1926)
- 14) Dolejs, L., Herout, V. und Sorm, F.,
Chem. and Ind. May 3., 530 (1958)

- 15) Doub, L. und Vandenbelt, J.M.,
J.Amer.chem.Soc. 69, 2714 (1947)
- 16) Eichler, O. und Scholtze, H.G.,
Klin.Wschr. 19, 517 (1940)
- 17) Gattermann-Wieland,
"Die Praxis des organischen Chemikers"
37.Aufl., S.330, Walter de Gruyter Verlag
(1956)
- 18) Gross, A.J. und Sizer, I.W.,
J.Biol.Chem. 234, 1611 (1959)
- 19) Hais, I.M. und Macek, K.,
"Handbuch der Papierchromatographie"
Bd.I, S.319, VEB Gustav Fischer Verlag,
Jena (1958)
- 20) Hais, I.M. und Macek, K.,
"Handbuch der Papierchromatographie"
Bd.I, S.744, VEB Gustav Fischer Verlag,
Jena (1958)
- 21) Hecker, E. und Karlson, P.,
Chemie-Ing.-Techn. 25, 397 (1953)
- 22) Hess, K. und Frahm, H.,
Chem.Ber. 71, 2627 (1938)
- 23) Holzer, K. und Zinke, A.,
Mh.Chem. 84, 901 (1953)
- 24) Küster, Thiel, Fischbeck,
Logarithmische Rechentafeln, 68-73.Aufl.,
Walter de Gruyter Verlag (1956)
- 25) Ludwig, H. und Kromayer, A.,
Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges.
161, 1 (1862)
- 26) Mason, H.S.,
Advanc.Enzymol. 19, 79 (1957)
- 27) Michl, H. und Högenauer, G.,
Mh.Chem. 91, 500 (1960)
- 28) Naumann, Th.,
Dissertation Freie Universität Berlin
in Vorbereitung; Vorveröffentlichung
Naturwissenschaften 50, 734 (1963)
- 29) Reubert, W.,
Dissertation Freie Universität Berlin 1960
Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges.
294, 17 (1961)

- 30) Salkowski, H., Chem. Ber. 12, 1438 (1879)
- 31) Schenck, G., Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 277, 132 (1939)
- 32) Schenck, G. und Graf, H., Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 274, 537 (1936)
- 33) Schenck, G. und Graf, H., Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 275, 36 (1937)
- 34) Schenck, G. und Schreiber, W., Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 278, 185 (1940)
- 35) Schenck, G., Schreiber, W. und Graf, H., Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 278, 337 (1940)
- 36) Schenck, G., Späth, E. und Schreiber, W., Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 277, 203 (1939)
- 37) Schmitt, A., Botanisches Arch. 40, 516 (1940)
- 38) Sell, H. E., Dissertation Freie Universität Berlin 1956
- 39) Spassow, A., Chem. Ber. 75, 779 (1942)
- 40) Späth, E., Lorenz, R. und Kuhn, H., Mh. Chemie 82, 114 (1951)
- 41) Späth, E., Schenck, G. und Schreiber, W., Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 277, 203 (1939)
- 42) Stahl, E. und Schorn, P. J.
in "Dünnschicht-Chromatographie"
S. 397, herausgegeben von E. Stahl,
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-
Heidelberg (1962)
- 43) Steiner, M.
in "Methoden der Fermentforschung"
Bd. I, S. 761, herausgegeben von E. Bamann
und K. Myrbäck, Verlag Georg Thieme,
Leipzig (1941)
- 44) Suchy, M., Herout, V. und Sorm, F.,
Collect. czechoslov. chem. Commun.
25, 2777 (1960)

- 45) Utermark, W. und Schicke, W.,
Schmelzpunkttabellen organischer Verbindungen, S. 376, Verlag Friedrich Vieweg und Sohn, Braunschweig (1963)
- 46) Veibel, S.,
"Analytik organischer Verbindungen" S.169, Akademie-Verlag, Berlin (1961)
- 47) Vogel, A.J.,
J.chem.Soc. (London) 624 (1948)
- 48) Waldi, D.
in "Dünnschicht-Chromatographie" S.501
herausgegeben von E.Stahl, Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)
- 49) Walz, B.F.,
Dissertation Universität Heidelberg 1839
- 50) Wendt, F.,
Dissertation Freie Universität Berlin 1952
Mikrochim.Acta 38, 554 (1951)
- 51) Wessely, F., Lorenz, R. und Kuhn, H.,
Mh.Chemie 82, 322 (1951)
- 52) Westerfeld, W.W. und Lowe, Ch.,
J.Biol.Chem. 145, 463 (1942)
- 53) Weygand, C.,
"Organisch-chemische Experimentierkunst"
2.Aufl. S.353, herausgegeben von Th.Siebenmark, Verlag J.Ambrosius Barth, Leipzig (1948)

LEBENS LAUF

Am 5. April 1932 wurde ich als Sohn des Röntgenfacharztes Dr.med.Fritz Walter und seiner Ehefrau Charlotte, geb.Bertram, in Hamburg geboren. Im Februar 1954 bestand ich das Abitur an der Sachsenwaldoberschule Reinbek.

Von April 1954 war ich Praktikant in der Lindenapotheke Hamburg-Bergedorf und bestand im März 1956 in Hamburg das Vorexamen. Nach einem viersemestrigen Studium an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br. wechselte ich zur Universität Hamburg und bestand dort nach zwei Semestern im Mai 1959 das pharmazeutische Staatsexamen.

Darauf arbeitete ich als Kandidat in der Titisee-Apotheke, Titisee/Schwarzwald. Im Mai 1960 begann ich bei Herrn Professor Dr.Gerhard Schenck am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin meine Doktorarbeit und war außerdem als Hilfsassistent tätig. Die Approbation zum Apotheker erhielt ich am 1. Juni 1960. Seit Juli 1961 bin ich wissenschaftlicher Assistent am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin.

Xerografie-Druck
Chemoprint OHG
Gießen